

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
Departamento de



TESIS DOCTORAL

**Estimulación específica del sistema inmunológico frente a  
enfermedades producidas por priones**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Natalia Fernández Borges**

DIRECTOR:

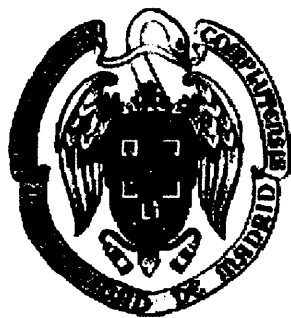
**Fernando Rodríguez González**

Madrid, 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE  
5325629903

T 577.15  
FER  
est

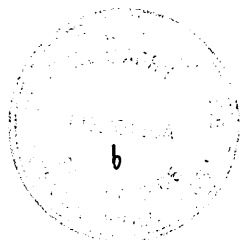


UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS.  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

**ESTIMULACIÓN ESPECÍFICA DEL  
SISTEMA INMUNOLÓGICO FRENTE  
A ENFERMEDADES PRODUCIDAS  
POR PRIONES**

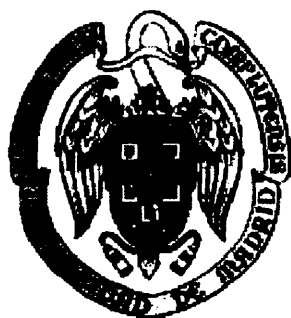
NATALIA FERNÁNDEZ-BORGES

Madrid, 2007



i 35765483





UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS.  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

**ESTIMULACIÓN ESPECÍFICA DEL  
SISTEMA INMUNOLÓGICO FRENTE  
A ENFERMEDADES PRODUCIDAS  
POR PRIONES**

Memoria presentada por **Natalia Fernández-Borges**  
para optar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas  
por la Universidad Complutense de Madrid

Madrid, 2007

*A mis padres,  
por todo...*

*A Isaac,  
por tus principios,  
por tus sueños, ...*

*A la enana...*



Uno de los capítulos que más ganas he tenido de escribir a lo largo de esta tesis es el de agradecimientos, dado que sin la ayuda y apoyo de todas las personas que figuran en él este trabajo nunca hubiera sido posible.

En primer lugar quiero dar las gracias a mi director de tesis, el Dr. Fernando Rodríguez, el darme la oportunidad de llevar este trabajo a cabo. También a mi codirector, el Dr. Alejandro Brun, por su apoyo constante.

A mi amigo Fer, una de las mejores personas que he conocido y que ha hecho que me enamore de la ciencia, que me ha motivado en todo momento y que siempre ha sido capaz de sacarme una sonrisita en un mal momento. Nunca podré olvidar todo lo que me has aportado, no sólo a nivel científico, sino sobre todo, a nivel humano...¡¡¡Muchísimas gracias, jefe!!! sigo manteniendo que ojala “de mayor” sea como tú...Trataré de llevar siempre conmigo una pequeña dosis de tu positividad ante todo.

Alejandro, por aportarme la tranquilidad necesaria en este mundillo y por estar siempre ahí. También quiero agradecer tu calidad humana, el resto tenemos mucho que aprender...no a todo el mundo se le construye un confesionario!!!

A ambos mil gracias por todo lo que he aprendido a lo largo de estos 4 años, sé que he sido muy afortunada y siempre seréis mi ejemplo a seguir.

Y es que la nuestra ha sido una tesis “trotamundera”, pero bueno, al final no ha salido nada mal ¿verdad? Pues basándome un poco en todo nuestro camino recorrido creo que para hacerlo más sencillo y tratar de olvidar al menor número de personas posible voy a ir haciendo paradas en cada uno de los lugares en que esta tesis ha acontecido.

En primer lugar, quiero agradecer a todo el personal de la unidad de investigación del Hospital XII de Octubre, por hacerme sentir una más en los

primeros días en que empecé esta “andadura doctoral”. Aunque no pude estar mucho tiempo entre vosotros, me llevo un bonito recuerdo.

En segundo lugar, quiero mencionar aquí uno de los lugares que nunca olvidaré y que es Valdeolmos. Quiero agradecer muy especialmente al Dr. Esteban Domingo el darme la oportunidad de formar parte “como uno más” del personal del CISA, y al Dr. Juan María Torres permitirme trabajar en su laboratorio. Quiero dar las gracias a todo el personal de este centro todo lo que me habéis enseñado y con el cariño que lo habéis hecho. Quiero agradecer a la antigua generación del L1 y L2 todo vuestro apoyo en mis primeros “pasitos” con los priones: Joaquín, Mónica Morales, Mariu, Rubén, Paula, Garuti..., pero existen dos personas a las que quiero destacar y son Chus y “mi reina” Bea. Chus, por tu ayuda constante, no sólo en lo laboral, sino también en lo personal, muchas gracias por todo...y que bien nos salieron los Western Blot!!! A Bea, la reina del laboratorio, la persona que más me ha enseñado a píc de poyata. Por tener tus brazos abiertos cuando llegué y darme tanto apoyo. Yo tampoco podré olvidar nunca las conversaciones a píc de cabina pasando a “tus niñas”... Gracias por hacerme sentir que la habitación del fondo es la mía. Gracias por todo, Bea!!

No puedo olvidar tampoco al personal del L12, al grupo aftoso que tanto habéis hecho por mí. A destacar tres personas muy especiales para mí: Paloma, mil gracias por todo lo que me ayudaste y enseñaste; Belén, por todo tu apoyo y discusión científica y Llili, por nuestras sufridas endofrees delante de la Sorvall...mira que bien nos fue al final!!!

Quiero agradecer también al personal de infecciosas de la facultad de veterinaria de la universidad autónoma de Barcelona el haberme hecho un sitio y proporcionarme ese trocito de poyata que tantos frutos ha dado de sí. Quiero

agradecer muy especialmente el buen humor de mi compañera de “labo” de aquella y ésta época, Raquel Rivas, por tener siempre una sonrisa en tu cara.

Muchas gracias al personal “priónico” de Algete por vuestra gran ayuda, gracias Tomás, gracias Pinilla y gracias Bea.

También muchas gracias a todo el grupo de Priocat por vuestra ayuda y sobre todo por vuestra disposición a dárme la en todo momento.

Finalmente gracias al Dr. Mariano Domingo el darme la oportunidad de formar parte de la gran familia del CReSA. Quiero agradecer a todo el personal haber entendido en todo momento mis pequeñas dificultades con el catalán. Gracias a Montse Pastó y Olga por resolverme siempre cualquier papeleo y lo más importante, hacerlo siempre con una sonrisa en la cara. Gracias a Montse Ordoñez por los buenos momentos compartidos en la facultad. Gracias a Vicky, por haber sido mi “mamá catalana” y haber compartido tantos madrugones juntas en el labo. Gracias a los “becaris”, tanto las viejas como las nuevas generaciones. Gracias a Nuria Busquets por tu apoyo desde que llegaste. Gracias Nilsa, por ser como eres y dejarte querer. Gracias a Enric Vidal, porque siempre tienes una solución a mis problemas, por tu ayuda cuando la he necesitado y por las risas que nos hemos echado juntos. Gracias a Ayub por su fomento del inglés en el CReSA. Gracias a Quim por los buenos días de cada mañana. GRACIAS A TODOS!!

A mis niños Eva y Jordi por todos nuestros momentos. Creo que en este caso sobran las palabras, no porque ya se hayan dicho, sino porque no tendría suficiente espacio para escribir todo lo que os tengo que agradecer. Espero que un simple “mil gracias” refleje de un modo muy resumido todo...aunque aprovecho para saludar a ....!!!Je,je. Ojala algún día nuestros caminos profesionales se juntaran de

nuevo (y sigamos haciendo nuestros trenes *chu chu* por el labo) porque me quito la gorra y os digo que ha sido un auténtico placer trabajar con vosotros!!! Chapooooo

A un modo más “personal” existen una serie de personas que indirectamente me han apoyado mucho a lo largo de este camino.

Mónica Enguita, una bellísima persona, mi compañera de batallas durante la carrera, tanto dentro como fuera de la facultad. También mi compañera durante unos meses en el CISA, con las extremas condiciones P3 que hacen que ciertas cosas se caigan sin control...je,je.. Mil gracias Mónica por aportarme siempre esa sangre que a veces me falta en las venas y sobre todo por todo tu apoyo y consuelo en los malos momentos. A ver si algún día nos montamos ese labo juntas,...aunque ya no sea el de secuenciación...y mantengamos nuestros principios...aunque ya no sean tan sagrados!!

A mis niños del piso de Francos Rodriguez número 30: Pepea, Roberto y Dani, por hacer de conejillos de indias en mis primeras experiencias en la cocina, por esas cenas tan amenas y sobre todo...por esas lecciones prácticas de cómo construir un puente sobre la M30 sin que caiga!!, gracias a todos, aunque siempre nos quedarán “infinitas” cosas por hacer...

Mil gracias a Soraya (y a Fer) por abrirme las puertas de tu casa y hacerme sentir como en la mía. Gracias por enseñarme a hacer mis primeros pedidos y gracias por ayudarme a elegir el título de la tesis, situaciones tan alejadas en el tiempo y que, curiosamente han abierto y cerrado esta etapa.

A Pepe, por admitirme como okupa en su casa tantas y tantas veces.

A los “casleños” por esas cenitas y salidas tan divertidas, gracias por vuestros ánimos.

A Ana Edderra, por guiarme hasta aquí, por ser la persona que me hizo decidirme por la ciencia.

A Josean, por tu apoyo, especialmente en los comienzos de esta tesis.

A los desertores catalanes, por los buenos momentos y por la gran pinya ferrosellana que hemos hecho. Muy especialmente gracias a Javi, por estar siempre pendiente de mí... y lo dicho, algún día veremos la luz!!!

Gracias a los “mousínos” Angel y Chelo, por miles de cosas, pero especialmente por haber estado ahí cada sábado con la prima pretésica... y como no...arriba los súperdesayunos!!! Y quién sabe...nos veremos en Miami!!!, ¿y en Holanda? ¿o quizás en Madrid? Muchas gracias por hacer que muchas de las horas de soledad se llenaran con vuestra presencia y gracias por hacerme reír tanto.

A Dani y Rubén, por vuestro constante apoyo.

A toda mi familia por vuestro apoyo, por todo vuestro cariño y por enseñarme a relativizar las cosas.

A Miguel, por todos los buenos momentos pasados y por apoyarme tanto en los malos. Gracias por enseñarme tantas cosas de la vida y por hacerme sentir una persona muy especial. Gracias por tu paciencia durante todo este tiempo. Yo sigo soñando...

Mis padres, desde luego, son las dos personas que deben llevarse absolutamente todos los méritos de este trabajo, porque sin su apoyo constante no hubiera sido posible. Ellos me han aportado toda la entereza y solidez y especialmente, y lo más importante, me han enseñado a creer en mí. Gracias por todo lo que me habéis dado y seguis dando en la vida. Y también perdón por no haber sabido controlar mis nervios en estos últimos tiempos... Gracias papá por no esperar nunca menos de mí y



gracias mamá por todos esos cafés que tanto me han ayudado a despejar mi “cabezota”.

A Isaac, por llenar mi vida con la de un niño, por ser una de las personas más buenas que tengo en mi vida y una de las que más quiero. Espero que algún día puedas alcanzar todo aquello que deseas y quiero darte las gracias por sentirte orgulloso de tu “tata”, porque eso siempre me ha dado muchas fuerzas para seguir adelante...

Finalmente, gracias abuelo Federico por enseñarme (aún siendo muy pequeñita) a luchar por las cosas, aunque fuera a través de una partida a la escoba...

En el fondo, los científicos somos gente con suerte, podemos jugar a lo que queramos durante toda la vida.

Lee Smoli

Prion diseases or transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) are a family of rare progressive neurodegenerative disorders that affect both humans and animals. They are distinguished by long incubation periods and characteristic spongiform changes associated with neuronal loss.

The causative agent of TSEs is an abnormally folded prion protein ( $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ ) that is capable to transform the normal cellular prion protein ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ) in new infectious transmissible material. The progressive accumulation of  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  finally leads to brain damage and the characteristics signs and symptoms of these fatal diseases.

Emerging data indicate that this devastating group of diseases may be amenable to immunotherapy and immunoprophylaxis, raising the prospect that the spread of these diseases may be countered by vaccination. The main objective of this study was the development of new therapeutic strategies to treat prion diseases, attempting to stimulate the immune system (both humoral and cellular responses) using DNA vaccination.

In the first part of this work we demonstrated the capability of the human prion protein to induce an immune response in mice after DNA immunization. Interestingly, the immune response induced by the wild type human prion protein was qualitatively different to that induced by mutant variants associated to prion diseases. While immunization with plasmids expressing the wild type human protein induces strong humoral responses, vaccination with the mutant variants mainly induces potent  $\text{CD8}^+$  T cell (CTL) responses. In spite of the responses induced, no protection was observed against the intracranial challenge with mouse adapted  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ .

In the second part of this work we developed some strategies to improve the antigen presentation of the DNA vaccines, in this case, expressing different versions of the homologous mouse prion protein. While the plasmid expressing the mouse prion by it self (pCMV-PrPm) does not induce detectable immune responses in mice, vaccination with the plasmid pCMV-PrPmLII, expressing the prion protein fused to a lysosome-targeting signal, was capable to break tolerance inducing strong humoral and cellular (both  $\text{T-CD8}^+$  and  $\text{T-CD4}^+$ ) responses against the prion protein. Most importantly, this DNA vaccine conferred significant protection against intracranial prion challenge, dramatically delaying the onset of disease.



- $\mu\text{g}$ : Microgramo.
- $\mu\text{l}$ : Microlitro.
- $\mu\text{M}$ : Micromolar.
- A117V: Mutación en el gen de la PrPh que provoca la sustitución de una alanina por una valina en posición 117.
- ABTS: (2-2'azino-di-(3etil benzothiazol-sulfona-6) (diamino).
- ADN: Ácido desoxirribonucleico.
- ARN: Ácido ribonucleico.
- BFA: Brefeldina A.
- BHK-21: Fibroblastos de riñón de hámster.
- BSA: Seroalbúmina bovina.
- BSE<sub>1</sub>: Mezcla de 49 troncos encefálicos de vacas con EEB, confirmadas por histopatología.
- BTT: Fusión de un epítipo B de VFA (sitio A localizado en la proteína estructural VP1) y dos epítipos T-CD4<sup>+</sup> (localizados en la proteína no estructural 3A y en la proteína estructural VP4).
- CD: Célula dendrítica.
- CD4: Receptor de membrana expresado por los linfocitos T cooperadores.
- CD8: Receptor de membrana expresado por los linfocitos T citotóxicos.
- CDF: Célula dendrítica folicular.
- CI: Cadena invariante.
- CJD: Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob.
- CMH: Complejo mayor de histocompatibilidad.
- CMV: Citomegalovirus.
- CPA: Célula presentadora de antígeno.
- CpG: Citidil-guanil-oligodeoxinucleótidos.
- Cpm: Cuentas por minuto.
- CTL: Linfocitos T-CD8<sup>+</sup> citotóxicos.
- CTLA4: Antígeno-4 de los linfocitos T homólogo a CD28 y que se expresa en células T activadas.
- D.O.: Densidad óptica.
- D178N: Mutación en el gen de la PrPh que provoca la sustitución de un aspártico por una asparragina en posición 178.

- DMEM: Medio mínimo esencial de células de mamífero modificado por Dulbecco para el cultivo de células de mamífero.
- DMSO: Dimetilsulfóxido.
- DP: Diclorometileno bifosfanato.
- DTT: Ditioneitol.
- E200K: Mutación en el gen de la PrP<sup>sc</sup> que provoca la sustitución de un glutámico por una lisina en posición 200.
- EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.
- EEB: Encefalopatía espongiforme bovina.
- EET: Encefalopatía espongiforme transmisible.
- ELISA: Inmunoensayo específico ligado a enzima: método de detección de anticuerpos específicos basado en el reconocimiento de un antígeno sobre placa de 96 pocillos y basado en una reacción colorimétrica catalizada por enzimas.
- ET: Epítomos en tándem.
- FITC: Fluoresceína.
- g: Unidad de fuerza centrífuga relativa.
- GALT: Tejido linfático asociado a intestino.
- GP<sub>33</sub>: Epítomo CTL de la glicoproteína de LCMV localizado entre las posiciones 33 y 41.
- GPI: Grupo glicofosfatidilinositol.
- GPTh: Epítomo T-CD4<sup>+</sup> del virus LCMV localizado entre las posiciones 61 y 80 de la glicoproteína del virus.
- GSS: Síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker.
- HE: Hematoxilina-eosina.
- IBRS-2: Fibroblastos de riñón de cerdo.
- ICCS: Tinción intracelular de citoquinas.
- IFF: Insomnio familiar fatal.
- IFN: Interferón.
- Ig: Inmunoglobulina.
- IL: Interleuquina.
- IPTG: Isopropil-tio-b-D-galactopiranosido.
- ISS: Secuencias inmunoestimuladoras.
- K: KDa, KiloDalton

- Kb: Kilobases.
- KDa: KiloDalton.
- LAMPI: Proteína asociada a la membrana lisosomal de tipo I.
- LB: Medio de Luria Bertoni para el crecimiento de *E. coli*.
- LCMV: Virus de la Coriomeningitis linfocitaria del ratón.
- LII: Señal de transporte a lisosomas de la proteína LIMP II.
- LIMP II: Proteína integral de la membrana lisosomal de tipo II.
- LPS: Lipopolisacárido.
- LT  $\beta$ -R-Ig: Inmunoglobulina fusionada al receptor de la linfotoxina beta.
- LT $\alpha_1\beta_2$ : Citoquina linfotoxina  $\alpha_1\beta_2$ .
- M: Molar.
- mg: Miligramo
- MG34: Fusión de los epítomos CTL GP<sub>33</sub> y NP<sub>118</sub> del virus LCMV.
- ml: Mililitro.
- mM: Milimolar.
- ng: Nanogramo.
- NK: Células asesinas naturales del sistema inmunológico: células implicadas en la respuesta inmunológica innata.
- nm: Nanómetro.
- NP<sub>118</sub>: Epítipo CTL de la nucleoproteína de LCMV localizado entre las posiciones 118 y 126.
- NPTh: Epítipo T-CD4<sup>+</sup> del virus LCMV localizado entre las posiciones 308 y 328 de la nucleoproteína del virus.
- NS: Seroneutralización.
- nvCJD: Nueva variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob.
- OPD: Ortofenilendiamina.
- Optimem: Medio de cultivo de células de mamífero que contiene una cantidad reducida de suero fetal bovino, optimizado para realizar transfecciones (Invitrogen).
- ORF: Fase de lectura abierta.
- Pb: Pares de bases.
- PBS: Tampón fosfato salino.
- pCMV: Vector comercial para expresar genes en sistemas eucariotas bajo el promotor de citomegalovirus.

- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.
- pET 11 a: Vector comercial optimizado para expresar proteínas en *E. coli*.
- pGEMT easy: Vector comercial para el clonaje directo de productos de PCR.
- PK: Proteínasa K.
- Pm: Peso molecular.
- PMCA: Amplificación cíclica de proteínas desplegadas.
- PMSF: Fenilmetilsulfonil fluoruro.
- PrP: Proteína del prión.
- PrP<sup>C</sup>: Proteína del prión celular.
- PrP-Fc<sub>2</sub>: Proteína PrP fusionada a la fracción constante de la inmunoglobulina G<sub>1</sub>.
- PrPh: Proteína del prión humana.
- PrPKO: Ratones deficientes para el gen de la PrP.
- PrPm: Proteína del prión murina.
- PrP<sup>Rec</sup>: Proteína PrP recombinante.
- PrP<sup>res</sup>: Forma de proteína del prión infecciosa y resistente a proteasas.
- PrP<sup>Sc</sup>: Proteína infecciosa de prión.
- Q167R: Mutación en el gen de la PrP que provoca la sustitución de una glutamina por una arginina en posición 167.
- Q218K: Mutación en el gen de la PrP que provoca la sustitución de una glutamina por una lisina en posición 218.
- RE: Retículo endoplasmático.
- RK13: Células epiteliales de riñón de conejo.
- RML: Cepa de *scrapie* pasada por ratón.
- Rpm: Revoluciones por minuto.
- SAF: Fibras amiloides asociadas a *scrapie*.
- SDS: Dodecilsulfato sódico.
- SFB: Suero fetal bovino.
- SNC: Sistema nervioso central.
- SOD: Superóxido dismutasa.
- sp: Péptido señal del prión.
- Sup35: Factor de terminación del ribosoma.

- TAP: Transportador asociado a la presentación de antígenos en clase I, responsable de transferir los péptidos al retículo endoplasmático.
- Taq: *Termophilus acuaticus* (referido a la procedencia de la polimerasa usada en la PCR)
- TCID<sub>50</sub>: Valor recíproco de la dilución de suero en que se observa efecto citopático en el 50% de los pocillos de células.
- TCR Receptor específico de células T.
- TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral.
- TR: Rojo Texas.
- Ub: Monómero de ubiquitina.
- Ufp: Unidades formadoras de placas.
- Ure2p: Proteína reguladora del nitrógeno en levaduras.
- VERO: Fibroblastos de riñón de mono verde africano.
- VFA: Virus de la fiebre aftosa.
- VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana.
- VLA: Veterinary Laboratory Agency (UK).
- WB: Western Blot.





1. <b>INTRODUCCION</b>	1
1.1. Revisión histórica sobre las encefalopatías espongiformes transmisibles.	3
1.2. Características generales de la patogenia de las EETs.	5
1.3. Enfermedades priónicas causadas por mutaciones en humanos.	8
1.3.1. Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS)	8
1.3.2. Insomnio Familiar Fatal (IFF).	9
1.3.3. CJD familiar.	9
1.4. La proteína del prión celular: PrP <sup>C</sup>	10
1.5. Proteína del prión patógena: PrP <sup>Sc</sup>	12
1.5.1. Transformación de la proteína del prión a la isoforma patógena y el fenómeno de barrera de especie.	13
1.6. Implicación del sistema inmunológico en la patogénesis de las EETs.	14
1.6.1. Fase de entrada del prión.	15
1.6.2. Fase de transporte del prión a los sitios de acumulación y replicación	16
1.6.2.1. Las células dendríticas.....	17
1.6.3. Fase de acumulación del agente infeccioso.	18
1.6.3.1. Las células dendríticas foliculares.....	19
1.6.4. Fase de transporte de la proteína del prión infecciosa desde los tejidos linfoides hasta el sistema nervioso central.	21
1.7. Terapias y profilaxis frente a las enfermedades causadas por priones.	24
1.7.1. Bloqueo de los componentes implicados en la conversión de PrP <sup>C</sup> a PrP <sup>Sc</sup> .	24
1.7.2. Estrategias basadas en la modulación del sistema inmunológico.	26
1.7.2.1. Depleción de las células dendríticas foliculares.....	26
1.7.2.2. Estimulación del sistema inmunológico innato.....	27
1.7.2.3. Terapias basadas en anticuerpos.....	29
1.7.3. Presente y futuro de la inmunoterapia frente a priones	33
1.8. Vacunación con ADN.	35
1.8.1. Las rutas de presentación antigénica.	36
1.8.1.1. Presentación antigénica por la vía del CMH de clase I.....	37
1.8.1.2. Presentación antigénica por la vía del CMH de clase II.....	38
1.8.2. Estrategias de potenciación de la presentación antigénica.	40
1.8.2.1. Potenciación de la respuesta T-CD8 <sup>+</sup> (citotóxica) tras la vacunación optimizando la presentación antigénica por clase I del antígeno vacunal.	40
1.8.2.2. Potenciación de la respuesta T-CD4 <sup>+</sup> (T cooperadora) tras la vacunación optimizando la presentación antigénica por clase II del antígeno vacunal.	42
1.8.2.3. Potenciación de la respuesta inmunológica dirigiendo los antígenos a las CPAs, sitios de inducción de la respuesta inmunológica: Potenciación de la respuesta humoral y celular	43

2. OBJETIVOS	45
3. MATERIALES Y MÉTODOS	49
3.1. Líneas celulares empleadas.	51
3.2. Animales y protocolos de inmunización.	51
3.3. Agentes infecciosos utilizados.	52
3.3.1. Inóculo de prión infeccioso.	52
3.3.1.1. Inoculación de los animales con inóculo de prión infeccioso y seguimiento de los signos clínicos característicos de las EETs.....	52
3.3.2. Virus de la Fiebre Aftosa (VFA)	53
3.3.3. Virus de la Coriomeningitis Linfocitaria del ratón.	53
3.3.3.1. Análisis de la carga viral en animales infectados con LCMV.....	54
3.4. Obtención de plásmidos derivados del pCMV utilizados en protocolos de vacunación con ADN y estudios de expresión in vitro.	54
3.4.1. Obtención de plásmidos derivados del pCMV conteniendo el gen del prión murino (PrPm).	55
3.4.2. Obtención de plásmidos derivados del pCMV conteniendo distintas variantes del gen del prión humano (PrPh).	57
3.4.3. Obtención de plásmidos derivados del pCMV conteniendo distintas variantes del gen del prión humano fusionadas a una serie de epítomos en tándem (ET).	59
3.4.4. Obtención de plásmidos derivados del pCMV conteniendo los epítomos BTT del virus de la fiebre aftosa.	63
3.4.5. Expresión in vitro de las distintas variantes del prión a partir de los plásmidos derivados de pCMV.	64
3.5. Obtención de plásmidos derivados del pET 11a y expresión de las proteínas maduras del prión en Escherichia coli.	66
3.5.1. Obtención de plásmidos derivados del pET 11a conteniendo distintas variantes del gen del prión para su expresión en E. coli.	66
3.5.2. Inducción de la expresión de las proteínas maduras del prión en E. coli.	67
3.6. Caracterización de la respuesta inmunológica tras la vacunación con ADN.	69
3.6.1. Medición de la respuesta humoral o de anticuerpos.	69
3.6.1.1. ELISA para detectar anticuerpos específicos frente al prión. ....	69
3.6.1.2. Western Blot para detectar anticuerpos específicos frente al prión.....	69
3.6.1.3. Métodos para detectar anticuerpos frente al VFA. ....	70
3.6.1.3.1. ELISA específico frente al VFA.	70
3.6.1.3.2. Seroneutralización de VFA.	70
3.6.2. Medición de la respuesta celular mediante un ensayo de tinción intracelular de interferón gamma (IFN $\gamma$ ).	71
3.6.3. Medición de la respuesta celular mediante un ensayo de linfoproliferación.	72

3.7. Análisis comparativo de la acumulación de PrP <sup>res</sup> en el encéfalo de los ratones vacunados con ADN.	72
3.7.1. Histopatología e inmunohistoquímica.	72
3.7.2. Western blot	73
4. <b>RESULTADOS</b>	75
4.1. Vacunas ADN contra el prión y el concepto de tolerancia.	77
4.2. Caracterización de la capacidad adyuvante del péptido señal (sp) del prión humano en protocolos de vacunación con ADN frente al virus de la fiebre aftosa.	79
4.3. Estudios de respuesta inmunológica frente a diferentes variantes de la proteína del prión.	85
4.3.1. Respuesta humoral o de anticuerpos frente al prión y sus “variantes patogénicas” tras la vacunación con ADN.	85
4.3.2. Respuesta celular citotóxica (CTL) frente al prión y sus “variantes patogénicas” tras la vacunación con ADN.	89
4.3.3. Estudios de protección frente a diferentes variantes de la proteína del prión.	95
4.4. Estrategias de potenciación de la respuesta inmunológica frente a la proteína del prión.	99
4.4.1. Respuesta humoral o de anticuerpos frente al prión murino tras la vacunación con ADN	100
4.4.2. Respuesta celular frente al prión murino tras la vacunación con ADN	103
4.4.3. Estudios de protección frente al desafío con el prión infeccioso tras la vacunación con ADN expresando el prión murino.	106
4.4.3.1. Respuesta humoral inducida en ratones normales tras la vacunación con ADN expresando diversas formas del prión murino	106
4.4.3.2. Respuesta celular inducida en ratones normales tras la vacunación con ADN expresando diversas formas del prión murino	108
4.4.3.3. Estudios de protección frente al desafío con el prión infeccioso tras la vacunación con ADN expresando el prión murino	109
5. <b>DISCUSIÓN</b>	113
5.1. La presentación antigénica de la PrP <sup>C</sup> humana y de sus variantes patogénicas es distinta: implicaciones en la respuesta inmunológica inducida en ratón tras la vacunación con ADN.	116
5.2. La vacunación con ADN puede romper la tolerancia frente a la proteína del prión y atenúa la enfermedad tras el desafío intracraneal con el prión infeccioso.	121
6. <b>CONCLUSIONES</b>	129

7.	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	133
8.	<b>ANEXO:</b> Valores numéricos de los resultados presentados en el trabajo	165

## 1. INTRODUCCIÓN

*El arte de la ciencia: repasar el camino,  
mirar lo que otros miraron  
y ver lo que otros no vieron.*

Javier Casares.



*The history of the SSE (Subacute spongiform encephalopathies)  
reads a bit like an Indiana Jones film"*  
(Sato y Roos, 1997)

### **1.1. Revisión histórica sobre las encefalopatías espongiformes transmisibles.**

La primera constancia escrita de lo que hoy conocemos como enfermedades causadas por priones la realizó McGowan en 1922 con la descripción de "*la tremblante*" (del francés, la tembladera) en ovejas, posteriormente denominada "*scrapie*" o tembladera ovina, y que se describió como una enfermedad infecciosa, transmisible y con un periodo de incubación largo (Cuille and Chelle, 1936).

Tradicionalmente se ha adjudicado a Creutzfeldt y a Jakob la paternidad de las primeras descripciones de esta enfermedad neurodegenerativa en humanos: enfermedad de Creutzfeldt Jacob o CJD (Creutzfeldt, 1920; Jakob, 1921a; Jakob, 1921b; Jakob, 1921c). La enfermedad se caracterizaba por provocar una degeneración extensa pero parcheada de la sustancia gris, con alteraciones neuronales difusas y astrogliosis que anatomopatológicamente se reconocía por la existencia de degeneración vacuolar en el córtex cerebral, junto a proliferación astrocítica y degeneración neuronal.

Posteriormente, en 1957 se describió una enfermedad encefálica relacionada con el canibalismo ritual realizado en Papúa Nueva Guinea a la que denominaron "*kuru*" (escalofrío), sin que en aquel momento fuera posible averiguar la causa ni encontrar una terapéutica que resultara eficaz (Gajdusek and Zigas, 1957).

La relación existente entre las enfermedades de *kuru*, CJD y *scrapie* y su naturaleza infecciosa no tardaría en ser demostrada. Mientras que en 1959 el veterinario americano Hadlow puso de manifiesto las similitudes clínicas y neuropatológicas existentes entre el *kuru* y el *scrapie* de los carneros, algún tiempo después, Gajdusek comprobó que el *kuru* conservaba características comunes con la enfermedad de CJD.

La incógnita a resolver en años sucesivos fue descubrir la naturaleza precisa del agente responsable de estas enfermedades, invisible a los métodos de detección del momento. Durante años se estuvo hablando de las "infecciones lentas", concepto propuesto en 1953 por Sigurdsson y colaboradores a partir de su experiencia en el estudio de dos enfermedades ovinas, *maedi* y *scrapie* (Sigurdsson et al., 1953). Sin embargo, el hecho de que nunca se pudiera aislar ningún virus, así como la ausencia de una respuesta inmunológica frente al citado agente, cambió el concepto de la época respecto a estas enfermedades. Los experimentos realizados por Alper y colaboradores



contribuyeron decisivamente a dicho cambio. Este grupo demostró mediante técnicas radiológicas, que la infectividad asociada con la enfermedad de *scrapie* resultaba extremadamente resistente a la inactivación mediante radiación ultravioleta e ionizante (Alper et al., 1967; Alper et al., 1966). Basándose en esta serie de hallazgos Griffith, en el año 1967, insinuó que el agente transmisible podría ser una proteína, sugerencia que fue tomada con mucho escepticismo por parte de la comunidad científica del momento (Griffith, 1967).

En el año 1982, Prusiner resucitó la idea original de Griffith y enunció la hipótesis de “sólo proteína”, acuñando por primera vez el término “prión” (del inglés, *proteinaceous infectious particle*) para definir a aquellas partículas proteicas infecciosas resistentes a la inactivación mediante procedimientos que alteran ácidos nucleicos, hipótesis por la que le valió ser distinguido con el Premio Nobel de Medicina en 1997. Dicha hipótesis proponía que el material infeccioso estaba compuesto exclusivamente por una proteína con la capacidad particular de auto replicarse en ausencia de ácido nucleico (Prusiner, 1982; Prusiner et al., 1998). El aislamiento a partir de material infeccioso de una proteína resistente a proteasas, permitió demostrar por primera vez que el agente infeccioso correspondía con una isoforma patógena (PrP<sup>res</sup>) de una proteína celular apatógena (PrP<sup>C</sup>), bautizada con el nombre de prión (Bolton et al., 1982).

Actualmente los priones constituyen las únicas partículas de origen biológico que contradicen el gran Dogma Central de la Biología enunciado por J.Monod en 1970: *“La secuencia de aminoácidos o estructura primaria de la proteína determina de manera unívoca el plegamiento de la proteína para adoptar su estructura terciaria. Es decir, entre las miles de configuraciones 3-dimensionales en principio posibles, sólo se adopta una.”*

A pesar de que la tembladera ovina causada por priones fue descubierta hace más de 200 años y que ésta se describió por primera vez en la literatura hace ya más de 80 años, no ha sido hasta 1985 cuando saltó una gran alarma en torno a estas enfermedades. La causa fue la detección en Gran Bretaña de una enfermedad en el ganado bovino cuya manifestación clínica consistía en una afección nerviosa acompañada de comportamiento agresivo y ansiedad en los animales. Fue denominada encefalopatía espongiforme bovina (EEB) o coloquialmente “mal de las vacas locas”. El análisis anatomopatológico del encéfalo mostró un patrón de lesiones muy semejante al descrito en la tembladera ovina. Desde entonces, se han diagnosticado más de 180.000

casos en el mundo (Anderson et al., 1996). La situación provocó una gran alarma social no únicamente por las pérdidas económicas sufridas en el sector ganadero, sino sobre todo por la aparición en el hombre de una variante de encefalopatía espongiforme, conocida como la nueva variante de Creutzfeldt-Jakob (nvCJD) y su demostrada vinculación al consumo de productos cárnicos procedentes de ganado vacuno afectado por EEB (Bruce et al., 1997; Prusiner, 1997). Desde entonces, los gobiernos de los países afectados han destinado grandes sumas económicas al desarrollo y mejora de métodos de diagnóstico y a la investigación en torno a las Encefalopatías espongiformes transmisibles (EETs).

Un buen ejemplo de esta política de investigación resulta el trabajo aquí presentado, financiado gracias a la acción estratégica de investigación frente a las EETs y seguridad alimentaria activada por el gobierno español en el año 2001 (EET 2001-4217-CO2-02).

## **1.2. Características generales de la patogenia de las EETs.**

La principal característica de este grupo de enfermedades es la acumulación en el cerebro de una isoforma patógena del prión ( $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ ), proteína que en su conformación normal ( $\text{PrP}^{\text{C}}$  o proteína del prión celular), se encuentra expresada en la membrana celular de forma constitutiva (Prusiner, 1991). A pesar de que ambas isoformas son idénticas en su secuencia primaria, la  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  puede distinguirse fácilmente de la  $\text{PrP}^{\text{C}}$  gracias a sus diferentes propiedades bioquímicas y biofísicas, como son la formación de agregados en presencia de detergentes y la resistencia poco habitual a la hidrólisis por enzimas proteolíticas (Pan et al., 1993).

La aparición y consiguiente acumulación de la isoforma patógena es debida a un proceso postraduccional sobre la proteína celular como consecuencia de su probable interacción con  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  (Gabizon and Prusiner, 1990). Aunque los mecanismos moleculares de este proceso denominado transformación, no son totalmente conocidos, únicamente parecen implicar cambios en la conformación de la proteína (Borchelt et al., 1990). Así pues, para la producción de proteína infectiva es necesaria la presencia de la isoforma celular, capaz de ser transformada. El hecho de que los ratones  $\text{PrP}^{\text{KO}}$  (del inglés *knock out*, ratones en que el gen codificante para la PrP había sido inactivado), fueran totalmente resistentes a la enfermedad tras la inoculación intracraneal con priones infecciosos, demostró definitivamente esta teoría (Bueler et al., 1993).

Ratificando esta teoría, la susceptibilidad a la infección se pudo reestablecer simplemente reintegrando en su genoma el gen de la proteína del prión (Fischer et al., 1996).

A pesar del escepticismo inicial por parte de algunos investigadores, las nuevas evidencias presentadas en los últimos años consolidan la teoría de “la proteína sola”, como la más plausible para explicar la patogenia de las EETs. Por un lado, se ha demostrado la capacidad de reproducir la enfermedad mediante inoculación intracraneal de fibras amiloides sintéticas de prión (Legname et al., 2004). Por otro lado, se ha conseguido amplificar *in vitro* el material infeccioso mediante la técnica de la PMCA (del inglés, cyclic amplification of protein misfolding), material que resulta infectivo tras inoculación experimental en ratones (Soto et al., 2005).

Las encefalopatías espongiformes transmisibles (EETs) comprenden un grupo de enfermedades degenerativas del sistema nervioso central (SNC) que afectan tanto al hombre como a diferentes animales. Comparten muchas características con otras enfermedades neurodegenerativas como son el Alzheimer, la enfermedad de Huntington y el Parkinson, en las que agente causal es una proteína constitutiva del organismo cuyo plegamiento es anómalo, pero difieren de éstas en que las EETs son de carácter infeccioso y transmisible entre diferentes especies. Sin embargo y a pesar de que resulta necesario realizar estudios en mayor profundidad para ratificar la naturaleza infecciosa del Alzheimer, recientemente se ha descrito el carácter infeccioso del péptido  $\beta$ -amiloides (Meyer-Luehmann et al., 2006).

Las EETs se caracterizan por la ausencia de lesiones macroscópicas, siendo las lesiones microscópicas encontradas: bilaterales, de distribución difusa, no inflamatoria y afectando casi exclusivamente al SNC. Así, para diagnosticar una encefalopatía espongiforme transmisible ha de observarse: Degeneración espongiforme del tejido con la presencia de vacuolas, gliosis, degeneración y muerte neuronal y depósitos de PrP<sup>Sc</sup> en el neuropilo y en los somas neuronales.

Las EETs se pueden presentar como i) enfermedades con un origen genético, ii) enfermedades transmitidas por una fuente de infección exógena y iii) enfermedades esporádicas. En la tabla 1 se clasifican las diferentes EETs que afectan a humanos y animales descritas en función de la especie hospedadora, de su origen y de sus posibles vías de transmisión.

Nombre	Especie hospedadora	Ruta de transmisión
Variante de Creutzfeldt-Jakob (nvCJD)	Humano	Ingestión de alimentos contaminados con el agente infeccioso de la EEB. Dos casos descritos debidos a una transfusión de sangre cuyo donante estaba infectado por nvCJD.
Creutzfeldt-Jakob esporádico	Humano	Desconocida. Se postula con mutaciones somáticas o conversión espontánea de PrP <sup>C</sup> a PrP <sup>Sc</sup> .
Creutzfeldt-Jakob iatrogénico	Humano	Exposiciones accidentales a tejidos contaminados con CJD o productos de tejidos contaminados.
Creutzfeldt-Jakob familiar	Humano	Mutaciones germinales en el gen de la PrP <sup>h</sup> .
Síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS)	Humano	Mutaciones germinales en el gen de la PrP <sup>h</sup> .
Insomnio Familiar Fatal (IFF)	Humano	Mutaciones germinales en el gen de la PrP <sup>h</sup> .
<i>Kuru</i>	Humano	Rituales de canibalismo.
<i>Scrapie</i>	Cabra y oveja	Ingesta de alimentos contaminados, transmisión horizontal. La transmisión vertical aún no se ha demostrado.
Encefalopatía espongiforme bovina (EEB)	Ganado vacuno	Ingesta de piensos contaminados con el agente infeccioso de la EEB.
Enfermedad debilitante crónica.	Mula, ciervo negro, ciervo blanco, alce de montaña y alce de América.	Ingesta de alimentos contaminados, transmisión horizontal. La transmisión vertical aún no se ha demostrado.
Encefalopatía espongiforme felina	Gato doméstico y felinos exóticos en cautividad (zoológico).	Ingesta de alimentos contaminados con el agente infeccioso de la EEB.
Encefalopatía transmisible del visón.	Visón.	Ingesta de alimentos contaminados. Fuente desconocida.
Encefalopatía de ungulados exóticos	Gran kudu, oryx árabe.	Ingesta de alimentos contaminados con el agente infeccioso de la EEB.

**Tabla 1: Clasificación de las encefalopatías espongiformes transmisibles que afectan a humanos y animales. Fuente: (Mabbott and MacPherson, 2006).**

En el ser humano, las EETs reciben diversos nombres según la sintomatología y signos clínicos encontrados e independientemente de su origen. Así, la enfermedad causada por priones con mayor incidencia en humanos, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD), puede tener diversos orígenes: esporádico, familiar o iatrogénico. Mientras que la forma esporádica supone el 85% de los casos, la iatrogénica únicamente supone el 1% del total de los casos. Además del CJD, existen otros tipos de EETs, algunas con un origen infeccioso, como el *kuru* y la nueva variante de Creutzfeldt-Jakob (nvCJD) y otras con un origen genético, como el Insomnio Familiar Fatal (IFF) y la enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheiker (GSS) (Prusiner, 1997). El 15% de enfermedades causadas por priones se deben a mutaciones germinales en el gen que

codifica para la PrP (CJD familiar, GSS e IFF) (Collinge, 2001; Wadsworth et al., 2003).

### **1.3. Enfermedades priónicas causadas por mutaciones en humanos.**

Los casos de CJD familiar, GSS e IFF representan los tres fenotipos principales de enfermedades por priones que contienen mutaciones en el gen que codifica para la proteína del prión humano (PrP<sup>h</sup>), localizado en el cromosoma 20 (Prusiner, 2001). Se han descrito más de 50 mutaciones que afectan a este gen, pero el 95% de los casos de esta enfermedad están asociados, bien a la existencia de inserciones de 5 ó 6 octapéptidos repetidos o bien a mutaciones puntuales que afectan a los codones 102, 178, 200 ó 210 (Capellari et al., 2005). Adicionalmente, la susceptibilidad a la enfermedad y/o en el fenotipo de enfermedad se ve afectado por el polimorfismo existente en el codón 129 del PrP<sup>h</sup>, que permite la presencia de una valina o de una metionina (Collinge et al., 1991; Lee et al., 2001; Mead et al., 2003; Palmer et al., 1991). Así, por ejemplo, la mutación D178N (Asp<sup>178</sup>=>Gln) con una metionina en posición 129 resulta en Insomnio Familiar Fatal (Goldfarb et al., 1992), mientras que la misma mutación con una valina en posición 129 resulta en un CJD familiar (Goldfarb et al., 1991b).

La patogenicidad de las moléculas del prión mutadas, se debe de nuevo a un plegamiento anormal de la proteína, en éste caso como consecuencia de la pérdida de puentes de hidrógeno y puentes disulfuro necesarios para mantener la estructura natural de la proteína del prión “normal” (PrP<sup>C</sup>) (Riek et al., 1998). En función del lugar en que se produce la mutación, la desestabilización de la PrP<sup>C</sup> resulta diferente, aunque anómala en todos los casos descritos. Así, la mutación A117V (GSS) desestabiliza la conformación de hélice  $\alpha$  de la proteína del prión “normal” (PrP<sup>C</sup>) en las posiciones 106 a 126, dando lugar a una proteína anómala y patogénica (Frauenfelder et al., 1991).

#### **1.3.1. Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS)**

La primera descripción de este síndrome se realizó en 1928 en una familia austriaca cuyos miembros presentaban ataxia cerebelar de progresión lenta acompañada de pérdidas cognitivas en el transcurso de la enfermedad (Gerstmann, 1928; Gerstmann et al., 1936). Los casos de GSS se caracterizan por una progresión en los signos

cerebelares, degeneración espongiiforme de la materia gris y depósitos de placas amiloides.

La mutación más frecuente que da lugar a este síndrome es la que afecta al codón 102 de la PrPh y transforma una prolina en una leucina (P102L) (Doh-ura et al., 1989; Goldgaber et al., 1989; Hsiao et al., 1989) aunque otras mutaciones se dan con frecuencia en determinados grupos étnicos (Yamada et al., 1993). Con una frecuencia menor se presenta la mutación que afecta al codón 117 de la PrPh y transforma una alanina en una valina (A117V) (Mastrianni et al., 1995).

Por último, aunque existen, los casos de GSS esporádicos, no asociados a ninguna mutación en el gen de la PrPh, resultan mucho menos frecuentes (Liberski et al., 1998).

### **1.3.2. Insomnio Familiar Fatal (IFF).**

Esta enfermedad fue descrita por primera vez en una familia italiana en 1986 (Lugaresi et al., 1986) pero no fue hasta 1992 cuando esta enfermedad se incluyó dentro del grupo de enfermedades causadas por priones (Medori et al., 1992).

Se caracteriza por una desorganización completa en los patrones del sueño, hiperactividad simpática y anormalidades endocrinas. Genéticamente presenta una mutación del gen en la posición 178, dando lugar a la sustitución del aminoácido aspártico por una asparragina (D178N).

La descripción de esta mutación asociada al IFF despertó un gran escepticismo dado que la misma había sido descrita previamente como característica de CJD familiar (Goldfarb et al., 1991b). La solución a este conflicto no tardó en llegar y en 1992 Goldfarb describió que este hecho era debido al polimorfismo del codón 129: FFI se asocia a la mutación D178N, Met 129 mientras que CJD va asociado a la mutación D178N asociada a Val en posición 129 (Goldfarb et al., 1992).

### **1.3.3. CJD familiar.**

Los casos de CJD se caracterizan por una progresión subaguda de demencia, signos motores y degeneración extensiva esponjosa de la sustancia gris cerebral, mayoritariamente acompañados de la formación de placas amiloides.

Los pacientes afectados por CJD familiar presentan un número variable de inserciones de octapéptidos repetidos en la región N-terminal de la proteína o bien

mutaciones puntuales en la misma. La mutación E200K, que afecta al codón 200 de la PrP<sup>C</sup> y transforma un glutámico en una lisina, es la de mayor incidencia en este fenotipo (Goldfarb et al., 1991a).

#### **1.4. La proteína del prión celular: PrP<sup>C</sup>**

La proteína del prión celular o PrP<sup>C</sup> es una sialoglicoproteína anclada en la membrana plasmática por una molécula de glicofosfatidilinositol (GPI) (Caughey and Raymond, 1991; Stahl et al., 1987) y asociada a microdominios ricos en colesterol y esfingolípidos insolubles a los detergentes (Kooyman et al., 1998). Está constituida por una cadena polipeptídica de aproximadamente 250 aminoácidos (Prusiner, 1993) y su peso molecular oscila entre 33 y 35 KDa, dependiendo del grado de glicosilación (Harris, 1999a; Harris, 1999b).

La PrP<sup>C</sup> está codificada por un gen de copia única localizado en el brazo corto del cromosoma 20 en el hombre, en el cromosoma 2 en ratón y en el cromosoma 13 en el caso de la vaca. La secuencia genética del mismo está altamente conservada en mamíferos, la homología aminoacídica se encuentra entre un 80-90%. El gen se expresa de manera constitutiva prácticamente en todos los tejidos, siendo su expresión más elevada en el tejido nervioso, fundamentalmente cerebro, cerebelo, médula e hipotálamo (Chesebro et al., 1985).

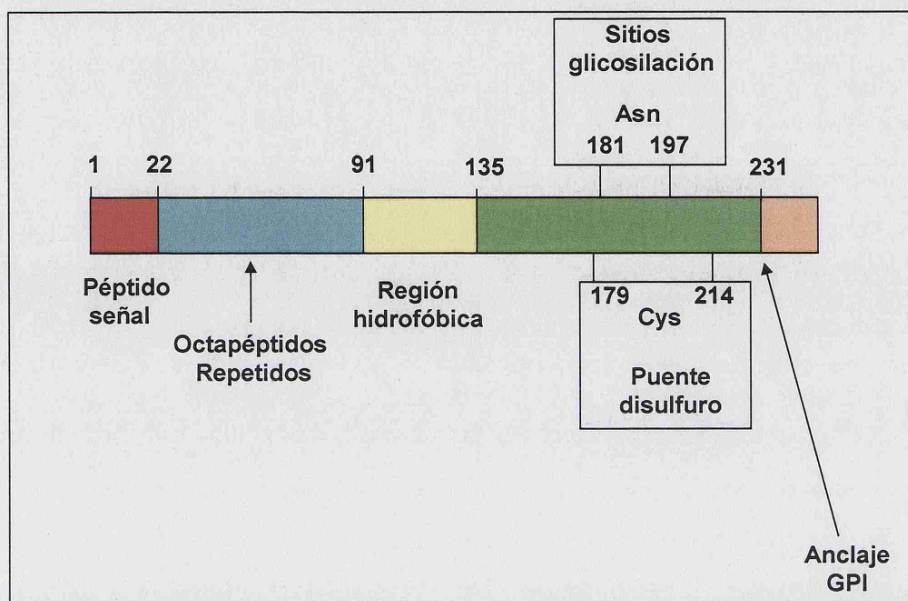
A día de hoy aún no se han podido definir claramente las funciones concretas de la PrP<sup>C</sup>, pero se sabe que está implicada en diversas actividades tales como en el metabolismo del cobre en las neuronas (Brown et al., 1997; Burns et al., 2003; Jobling et al., 2001), en fenómenos de transmisión sináptica (Collinge et al., 1994; Herms et al., 1999) y finalmente también se le atribuye una función neuroprotectora (Lasmezas, 2003).

Existen muchas otras funciones en las que parece que la PrP<sup>C</sup> se ve implicada y a las que se hará mención en el apartado 1.6., dado que están relacionadas con el sistema inmunológico.

La proteína del prión celular está constituida por 253 aminoácidos en el hombre, 254 en el ratón y hámster y por 256 en la vaca.

En la **estructura primaria** de la PrP<sup>C</sup> (referida al prión humano) se pueden diferenciar cinco regiones (Figura 1):





**Figura 1:** Esquema de la estructura primaria de la proteína PrP<sup>C</sup> humana.

**Región 1-22:** Comprende el péptido señal que dirige a la proteína hacia el retículo endoplasmático rugoso donde posteriormente será escindido, antes de su transporte a través del aparato de Golgi.

**Región 23-91:** En esta región se encuentran una serie de repeticiones de octapéptidos ricos en glicina y prolina muy conservados entre las diferentes especies. Estos octapéptidos son capaces de unir cobre y zinc (Lehmann, 2002). Posibles inserciones o deleciones en esta zona están asociados a la aparición de enfermedades familiares en humanos.

**Región 92-135:** Es una región hidrofóbica altamente conservada y a la que se asocia un papel crucial en la conversión de PrP<sup>C</sup> a PrP<sup>Sc</sup> (Wegner et al., 2002).

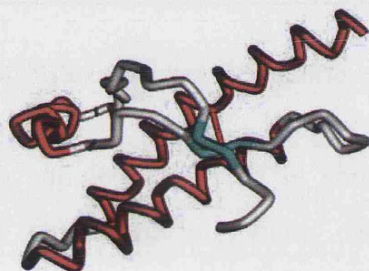
**Región 136-231:** En las posiciones 181 y 197 en que se encuentran dos aspárticos, existen 2 sitios de N-glicosilación (Endo et al., 1989; Haraguchi et al., 1989) que permiten la incorporación de azúcares. Esta incorporación de glúcidos es la responsable de la aparición de las tres formas características de esta proteína, representadas en la célula en proporciones distintas (entre paréntesis): no glicosilada (5%), monoglicosilada (25%) y biglicosilada (70%). Dos cisteínas en las posiciones 179 y 214 permiten la formación de un puente disulfuro intracatenario (Welker et al., 2002). En la posición 231 existe una serina capaz de unirse al grupo glicofosfatidilinositol (GPI) responsable del anclaje de la proteína a la membrana celular (Stahl et al., 1987).



**Región 232-253:** Corresponde a una región C-terminal hidrofóbica que actúa como péptido señal para el anclaje del grupo GPI y que es degradada durante la maduración de la proteína (Stahl et al., 1987).

La **estructura secundaria** madura de la proteína del prión celular está compuesta por un 42% de  $\alpha$ -hélice y un 3% de lámina  $\beta$ , detectado por medio de difracción infrarroja transformada de Fourier (Pan et al., 1993).

La **estructura terciaria** consiste en tres  $\alpha$ -hélices que conforman un núcleo ordenado en el extremo carboxilo terminal de la molécula y una zona amino terminal desestructurada y flexible (Zhang et al., 2000) (Figura 2).



**Figura 2:** Esquema estructura terciaria PrP<sup>C</sup>. En rojo se representan las  $\alpha$ -hélices y en azul las láminas  $\beta$ . Figura obtenida de la revista *Journal of Biological Chemistry* (Ziegler et al., 2003).

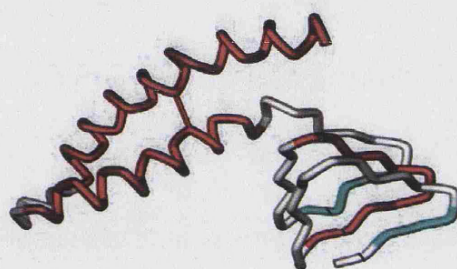
### 1.5. Proteína del prión patógena: PrP<sup>Sc</sup>

La PrP<sup>Sc</sup> es la isoforma anómala y patógena de la PrP<sup>C</sup> responsable de las encefalopatías espongiformes transmisibles.

Existen varias características diferenciales entre ambas isoformas de la proteína del prión: i) La PrP<sup>Sc</sup> es insoluble en detergentes no iónicos, mientras que la PrP<sup>C</sup> es soluble (Meyer et al., 1986), ii) La PrP<sup>Sc</sup> es más resistente a proteólisis que la PrP<sup>C</sup>. Así, mientras que la PrP<sup>C</sup> se digiere totalmente tras la digestión con proteasas a una concentración, tiempo y temperatura determinados (Chen and Gambetti, 2002), la PrP<sup>Sc</sup> se digiere sólo parcialmente, quedando un núcleo resistente de 27-30kDa, característica diferencial de la PrP<sup>C</sup> y en la que está basado uno de los métodos de diagnóstico de las EETs, iii) La PrP<sup>Sc</sup> presenta aspecto de fibrillas o bastoncillos cuando se observa al microscopio electrónico, tras su purificación mediante ultracentrifugación diferencial.

Estas agregaciones se denominan SAF (del inglés, *Scrapie Associated Fibrils* o *Prion Rods*) y corresponden a polímeros de PrP<sup>Sc</sup>.

Como ya se ha comentado anteriormente, la PrP<sup>C</sup> y la PrP<sup>Sc</sup> se diferencian únicamente en su estructura secundaria y terciaria. La PrP<sup>Sc</sup> tiene un contenido de un 43% de lámina  $\beta$  y un 30% de  $\alpha$ -hélice frente a la PrP<sup>C</sup> que contiene un 43% de  $\alpha$ -hélice y un 3% de lámina  $\beta$  (Cohen et al., 1994; Huang et al., 1996; Wille et al., 2002). La diferencia estructural entre ambas isoformas determina el plegamiento diferencial, haciendo que la PrP<sup>Sc</sup> adquiera un plegamiento anómalo cuya consecuencia es la formación de complejos supramoleculares que se acumulan y que caracterizan la enfermedad (Figura 3).



**Figura 3:** Esquema estructura terciaria PrP<sup>Sc</sup>. En rojo se representan las  $\alpha$ -hélices y en azul las láminas  $\beta$ . Figura obtenida de la revista *Journal of Biological Chemistry* (Ziegler et al., 2003).

#### **1.5.1. Transformación de la proteína del prión a la isoforma patógena y el fenómeno de barrera de especie.**

El mecanismo exacto de conversión de PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup> no se conoce con certeza. La PrP<sup>C</sup> sufre una transformación postraducciona a PrP<sup>Sc</sup> (Prusiner, 1991; Prusiner, 1997) que se caracteriza por un cambio drástico en las propiedades bioquímicas de la proteína (Prusiner, 1997; Taraboulos et al., 1992).

La PrP<sup>Sc</sup> se auto propaga mediante una reacción autocatalítica implicando ésta una interacción estrecha entre la PrP<sup>C</sup> endógena y la PrP<sup>Sc</sup> exógena (Cohen and Prusiner, 1998; Prusiner et al., 1998). Para explicar este fenómeno de conversión han sido descritos varios modelos (Caughey et al., 1995; Cohen and Prusiner, 1998; Jeffrey et al., 1995; Masel and Jansen, 2001; Masel et al., 1999; Prusiner et al., 1983).



En todo caso, este tipo de cambios postraduccionales no parecen únicos de los priones, habiéndose descrito en levadura al menos dos casos distintos: para la proteína reguladora del nitrógeno (Ure2p) y para el factor de terminación del ribosoma (Sup35). En ambos casos, las proteínas sufren procesos postraduccionales mediante los cuales su conformación se hace abundante en láminas  $\beta$ , adquiriendo resistencia a proteasas (Sparrer et al., 2000). El mecanismo mediante el cual se da esta transformación tampoco ha podido ser establecido hasta el momento actual.

Un fenómeno observado en las EETs es el fenómeno de la barrera de especie que se define como la dificultad de transmisión de priones en una especie diferente a la de origen del inóculo (Dickinson, 1976). Dicha barrera es fruto de un efecto acumulativo de factores tales como la eficiencia de conversión y la patología generada por la cepa seleccionada (Kimberlin et al., 1987; Kimberlin et al., 1989). Incluso se ha sugerido que este fenómeno depende de la incompatibilidad de secuencias entre la PrP de los animales donante y receptor (Prusiner et al., 1990).

Acompañado al hecho de que no todos los animales sucumben a la enfermedad cuando son inoculados con PrP<sup>Sc</sup> procedente de otra especie, se observa un periodo de incubación mucho más largo del característico de esta cepa en su especie original. Curiosamente estos tiempos de incubación se reducen a lo largo de pases sucesivos en la nueva especie, hasta que finalmente se estabilizan, implicando un fenómeno de “adaptabilidad” semejante al que ocurre para patógenos clásicos: virus y bacterias.

### **1.6. Implicación del sistema inmunológico en la patogénesis de las EETs.**

La acumulación del agente infeccioso en tejidos linfoides resulta un requisito fundamental para el desarrollo de la enfermedad, como queda demostrado por diversos hechos: i) La ausencia de placas de Peyer en ratones inoculados oralmente con *scrapie* impide la neuroinvasión (Prinz et al., 2003b), ii) El desafío intra-peritoneal con *scrapie* en ratones esplenectomizados tampoco produce neuroinvasión (Fraser and Dickinson, 1970), iii) Bloquear la acumulación del agente infeccioso en los nódulos linfáticos impide la invasión del sistema nervioso (Mohan et al., 2005a).

El tiempo de permanencia del prión en los tejidos linfoides y la magnitud de la implicación de cada uno de ellos puede variar considerablemente en función del

hospedador y de la cepa de prión (Foster et al., 2001; Glatzel et al., 2003; Jeffrey et al., 2002; Terry et al., 2003; Wadsworth et al., 2001)

Como ha sido comentado anteriormente, para que la PrP<sup>Sc</sup> se pueda acumular en los tejidos linfoides se hace necesario que interaccione con la proteína celular en las células del sistema inmunológico. De este modo, la PrP<sup>C</sup> se expresa en i) los linfocitos, viéndose implicada en diversas rutas de señalización (Bainbridge and Walker, 2005; Cashman et al., 1990; Li et al., 2001; Mattei et al., 2004), ii) en macrófagos, donde la PrP<sup>C</sup> puede considerarse un marcador de activación (directo o indirecto) que sufre el macrófago tras una infección (Brown and Besinger, 1998; Hutter et al., 2003), iii) en células dendríticas donde la PrP<sup>C</sup> parece ser capaz de inducir la maduración de las mismas (McBride, 2005).

Todas las EETs se caracterizan por un periodo de incubación asintomático muy largo que en humanos puede variar entre 1,5 y 40 años (Hilton, 2006). Este periodo de incubación tan largo se debe entre otros motivos, a la ineficiente replicación del agente infeccioso, que a su vez retarda su acumulación a la concentración necesaria para que tenga lugar la neuroinvasión.

Existen una serie de pasos críticos en la patogénesis de las EETs: la entrada del agente infeccioso (en el caso de que éste sea su origen), su acumulación en determinados tejidos, su replicación intracelular y su transporte final al sistema nervioso central donde causa las lesiones. Las células del sistema inmunológico han demostrado jugar un papel fundamental durante este proceso (Aucouturier and Carnaud, 2002), por un lado amplificando la señal (permitiendo la replicación de PrP<sup>Sc</sup>) y por otro actuando como “caballo de Troya” transportando el material infeccioso al SNC, evitando además su reconocimiento por parte de las defensas inmunológicas del organismo.

### **1.6.1. Fase de entrada del prión.**

Tras la ingesta de alimentos contaminados por priones (la ruta natural de infección), estos deben en primer lugar, atravesar el epitelio intestinal (Figura 4) para poder acceder a los tejidos linfoides, que como veremos más adelante, resultan esenciales para que la infección por priones progrese. Mediante sistemas *in vitro*, ha podido comprobarse que el agente causal del *scrapie* es capaz de penetrar a través de las células M del epitelio intestinal (Heppner et al., 2001a), vía de entrada de numerosos microorganismos (Neutra et al., 1996). A pesar de que son necesarios estudios *in vivo*

que lo confirmen, la resistencia de ratones con un número bajo de placas de Peyer (y por tanto de células M) al desafío oral con priones, parece ratificar esta teoría (Prinz et al., 2003b).

El hecho de que las células M estén especializadas en internalizar antígenos para su rápida diseminación hacia otras células distribuidas por el epitelio tales como macrófagos, linfocitos y células dendríticas (CDs) (Neutra et al., 1996), facilitaría su distribución por sistema inmunológico.

Recientemente se ha barajado la posibilidad de que para atravesar la barrera epitelial intestinal, el prión pudiera utilizar una vía alternativa de entrada utilizando mecanismos de endocitosis dependientes de ferritina, presentes en células epiteliales Caco-2 (Mishra et al., 2004). El hecho de que el núcleo resistente a proteasas de PrP<sup>Sc</sup> sea capaz de formar complejos proteicos asociados a ferritina, junto con la abundancia de ésta en los alimentos cárnicos, apoyan esta teoría.

Mientras que la ruta oral de infección se considera lenta y poco eficaz, la infección de priones a través de escarificaciones en la piel es una ruta de infección altamente efectiva (Carp, 1982; Taylor et al., 1996). Mientras que unos autores defienden el papel de las CDs de la piel en esta infección, otros apuestan por la entrada del agente infeccioso desde la piel a los nervios periféricos. Esta última hipótesis vendría avalada por la velocidad con que se disemina la PrP<sup>Sc</sup> hasta el sistema nervioso central en este caso.

### **1.6.2. Fase de transporte del prión a los sitios de acumulación y replicación**

Cuando la proteína de prión ha atravesado el epitelio intestinal, llega a una invaginación intraepitelial de las células M denominada bolsillo intraepitelial. Desde aquí, el agente infeccioso podría ser transportado por células B, T, macrófagos o células dendríticas situados en la lámina propia epitelial, hacia los tejidos linfoides donde se encuentran las células dendríticas foliculares (CDFs), células que como veremos más adelante, juegan un papel fundamental durante las fases de replicación y acumulación del prión infeccioso. A pesar de que los tipos celulares implicados en el transporte del prión varían dependiendo tanto del tipo de prión de que se trate como de la ruta de infección, a continuación se intentará resumir los aspectos más relevantes de esta etapa descritos en la literatura.

A pesar de que los linfocitos se localizan en el “bolsillo” intraepitelial de las células M, no parecen estar implicados en el transporte del agente infeccioso tras la exposición intra-intestinal, dado que no presentan altos niveles de PrP<sup>Sc</sup> en ningún momento durante el transcurso de la enfermedad (Huang et al., 2002).

El papel de los macrófagos resulta controvertido, al menos *in vitro* se ha demostrado que juegan un papel protector, limitando la infectividad de los priones (Carp and Callahan, 1981; Carp and Callahan, 1982). Esta teoría parece venir avalada por el hecho de que tratamientos *in vivo* con diclorometileno bifosfanato (DP), que depleciona temporalmente los macrófagos, provoca la rápida acumulación del prión en tejidos linfoides tras el desafío oral (Maignien et al., 2005) o intraperitoneal (Beringue et al., 2000) con el agente infeccioso. No obstante, este dato no excluye la posibilidad de que el macrófago tenga otros papeles en la patogénesis como pudieran ser el transporte o propagación en fases más avanzadas de la enfermedad.

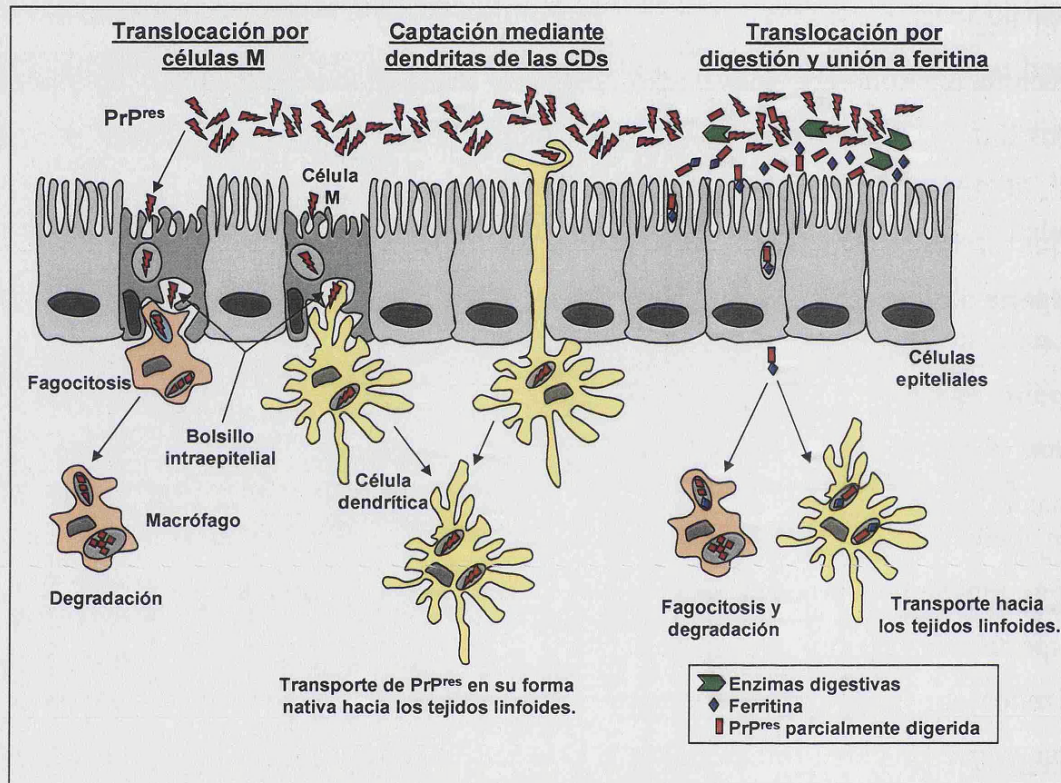
#### 1.6.2.1. Las células dendríticas.

Estudios *in vitro* han demostrado que la célula dendrítica es capaz de degradar el prión mediante cisteín proteasas (Luhr et al., 2004; Luhr et al., 2002; Mohan et al., 2005c), indicando por tanto que, al menos a priori, la CD no sería un buen candidato del transporte del agente infeccioso a los órganos linfoides. Sin embargo, trabajos realizados por otros autores demuestran la existencia de un subtipo de CD capaz de captar y retener en su forma nativa la proteína infecciosa PrP<sup>Sc</sup> (Huang et al., 2002; Mohan et al., 2005c). Curiosamente, este subtipo celular es único de entre las CDs, por su capacidad para migrar dentro de los folículos de células B (Wykes et al., 1998), área de los órganos linfoides donde se localizan las CDFs (Berney et al., 1999; Yu et al., 2002). La capacidad demostrada de ciertos péptidos específicos del prión de actuar como sustancias quimioatrayentes para las CDs, avalan aún más el papel de este subset celular, al menos como transportadores del PrP<sup>Sc</sup> (Kaneider et al., 2005; Kaneider et al., 2003), incluso por qué no de manera independiente a las células M insertando sus dendritas entre las células epiteliales del intestino (Rescigno et al., 2001).

Más recientemente se ha defendido incluso el papel de las CDs como transportadores directos de PrP<sup>Sc</sup> desde el intestino a las fibras nerviosas que inervan las placas de Peyer en el intestino (Defaweux et al., 2005; Hosoi et al., 1993). Así, la transferencia de priones a las terminaciones nerviosas del nervio esplénico y del nervio

vago podría ocurrir fácilmente en la región suprafolicular, sin que las CDFs intervinieran en el proceso (Aucouturier et al., 2001).

En resumen, aunque las células dendríticas parecen jugar un papel importante en la propagación de los priones hacia el sistema nervioso central, no conviene olvidar su papel fagocítico por lo que podrían jugar a su vez un papel protector frente a la infección degradando PrP<sup>Sc</sup> (Luhr et al., 2002), de una manera similar a lo descrito para los macrófagos.



**Figura 4:** Representación de los posibles mecanismos utilizados por la molécula del prion infeccioso para atravesar la barrera del epitelio intestinal. Fuente (Mabbott and MacPherson, 2006).

### 1.6.3. Fase de acumulación del agente infeccioso.

Tras la exposición inicial al agente infeccioso y antes de que tenga lugar la neuroinvasión, el prion se acumula en tejidos linfoides: bazo, nódulos linfáticos, tonsilas, apéndice y placas de Peyer (Eklund et al., 1967; Hadlow et al., 1987; Hilton et al., 1998; Kimberlin and Walker, 1979; Sigurdson et al., 1999).

Evidencias experimentales permitieron definir el tipo celular implicado en la propagación de priones como de baja densidad (Clarke and Kimberlin, 1984), de extensa vida media y mitóticamente quiescente (Fraser and Farquhar, 1987). Las células



dendromorfas de los folículos linfoides o células dendríticas foliculares (CDF) cumplen estos requisitos (Aucouturier and Carnaud, 2002; Kitamoto et al., 1991; McBride et al., 1992) y además poseen unos altos niveles de expresión de PrP<sup>C</sup>. También es el caso de los macrófagos y los linfocitos, que junto a las CDF, han sido descritos como posibles candidatos responsables de la acumulación y propagación del agente infeccioso (Beekes and McBride, 2000; Jeffrey et al., 2000; van Keulen et al., 1996).

Mediante técnicas de inmunohistoquímica y microscopía electrónica sobre secciones de tejido cerebral de varias especies afectadas por EETs, se ha observado que el agente infeccioso se localiza preferentemente en las CDF y en los lisosomas de los macrófagos de cuerpo tingible dentro de los centros germinales (Brown et al., 1999; McBride et al., 1992; van Keulen et al., 1996). Una de las funciones de los macrófagos dentro de los centros germinales es endocitar los inmunocomplejos (icosomas) atrapados en la superficie de las CDFs. Al igual que las CDFs, los macrófagos son células radiorresistentes (con bajo índice mitótico), por lo que, en principio, podrían estar involucradas en la acumulación de infectividad tras una infección periférica. Sin embargo, se pudo comprobar experimentalmente que la disminución de la población de macrófagos incrementaba la acumulación de PrP<sup>Sc</sup> y que se reducían significativamente los tiempos de incubación en bioensayos de ratón (Beringue et al., 2000). Este hecho sugiere, por un lado, que el papel de los macrófagos consistiría en la eliminación de los agregados de PrP<sup>Sc</sup>, y, por otro, que la degradación lisosómica de la PrP<sup>Sc</sup> en los macrófagos debe ser un fenómeno menos eficiente que la transformación de PrP<sup>C</sup> a PrP<sup>Sc</sup> (Brun et al., 2003).

Por tanto, mientras que las CDF parecen jugar un papel fundamental en la acumulación temprana y replicación del prión, el papel principal de los macrófagos sería impedir la acumulación del agente infeccioso eliminando los agregados de PrP<sup>Sc</sup>.

#### 1.6.3.1. Las células dendríticas foliculares.

Las células dendríticas foliculares (CDFs) están ubicadas en los folículos primarios de células B y en los centros germinales de los tejidos linfoides. A diferencia de las células dendríticas, las CDF son un linaje diferente derivadas de precursores no hematopoyéticos (Kapasi et al., 1993; Shortman and Liu, 2002) y no tienen funciones fagocíticas ni migratorias (Imazeki et al., 1992). Las CDF poseen largas dendritas capaces de atrapar y retener antígenos en su estado nativo y debido a que son células de



extensa vida media, pueden retener estos antígenos durante meses e incluso años (Mandel et al., 1980). Dada la asociación de las CDF a las células B se ha sugerido que las CDF podrían tener jugar un papel relevante durante la generación de respuestas de anticuerpos y en mantener la memoria inmunológica, aunque también se han asociado a muchas otras funciones (Haberman and Shlomchik, 2003; Kosco-Vilbois, 2003).

En lo que se refiere a la infección con priones, varios autores han demostrado la importancia de este tipo celular en los momentos tempranos de la infección; es decir, en las fases de acumulación y replicación del agente infeccioso.

En ausencia de células foliculares dendríticas, la neuroinvasión se ve retrasada y la susceptibilidad a la enfermedad reducida (Mabbott et al., 2000a; Mabbott et al., 2003; Mohan et al., 2005b; Montrasio et al., 2000). Mediante estudios *in vitro* se ha podido confirmar que las CDFs expresan altos niveles de PrP<sup>C</sup> (requisito necesario para la replicación del agente infeccioso) (Brown et al., 1999) y que la PrP<sup>Sc</sup> se acumula en el plasmalema y entre los espacios extracelulares alrededor de las dendritas (Jeffrey et al., 2000).

Para mantener a las CDFs en sus diferentes estados de maduración, son imprescindibles los estímulos de citoquinas procedentes de las células B (Mackay and Browning, 1998), entre los que la linfotoxina de membrana (LT  $\alpha_1\beta_1$ ) y el factor de necrosis tumoral (TNF  $\alpha$ ), juegan un papel fundamental. El bloqueo de los receptores LT $\beta$  o TNF, provoca la depleción temporal de las CDF (Mackay and Browning, 1998) y reducen la susceptibilidad a la enfermedad (Mabbott et al., 2000a; Mabbott et al., 2002; Mabbott et al., 2003; Mohan et al., 2005a; Montrasio et al., 2000), de un modo parecido a lo que ocurre en ratones carentes de células B (Klein et al., 1997; Mabbott et al., 2000b; Prinz et al., 2002).

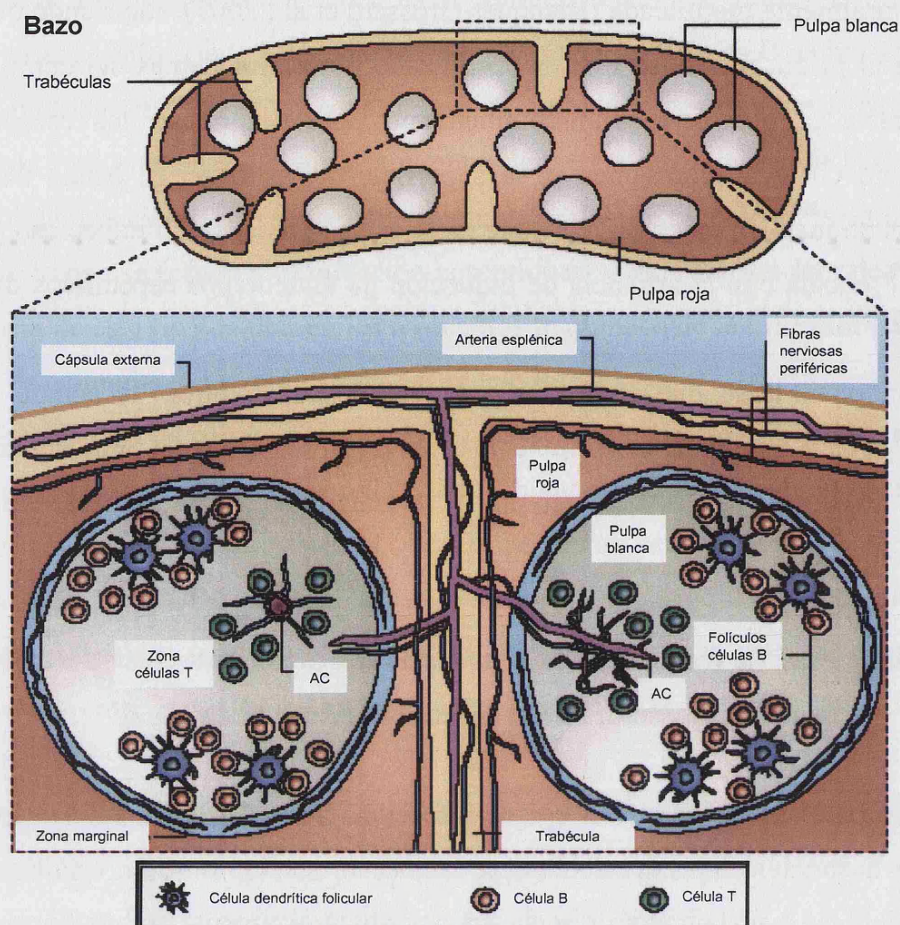
Demostrada la importancia de las CDF en la patogénesis de las EETs, la siguiente cuestión es el modo en que el prión es captado por este tipo celular. Normalmente, los antígenos captados por la CDFs se encuentran en forma de inmuno-complejos antígeno-anticuerpo y/o componentes del complemento. Las CDF reconocen los inmunocomplejos a través de la del receptor Fc del anticuerpo y/o a través de los receptores CR1 y CR2 del complemento (Yoshida et al., 1993). Mientras que deficiencias en los receptores Fc no afectan a la acumulación de priones, la ausencia de componentes del complemento (C1q, C2, C3 y factor B) o la ausencia de receptores de los mismos sí afectan a su acumulación en bazo (Klein et al., 2001; Mabbott et al., 2001). Además, estudios preliminares han demostrado que C1q es capaz de unirse a una

PrP estructuralmente modificada (Blanquet-Grossard et al., 2005), sugiriendo que tras la exposición al prión infeccioso este es opsonizado por componentes del complemento. En este caso, el complejo prión-complemento podría unirse a los receptores de complemento CR1/CR2 presentes en la superficie de las CDF. El hecho de que los anticuerpos no jueguen un papel relevante en la captación del prión infeccioso por parte de las CDF encaja con la ausencia de inducción de anticuerpos específicos durante la infección.

Otra posibilidad que se baraja actualmente para explicar la acumulación de priones en la CDF es que la forma infecciosa del prión sea capaz de unirse directamente a la PrP<sup>C</sup> expresada en la CDF como si se tratara de un receptor (Mabbott and MacPherson, 2006).

#### **1.6.4. Fase de transporte de la proteína del prión infecciosa desde los tejidos linfoides hasta el sistema nervioso central.**

Aunque el modo en que el agente infeccioso viaja desde las células foliculares dendríticas hasta las células del SNC no se conoce al detalle, lo que sí está claro es que no puede deberse a una sinapsis directa, ya que anatómicamente ambos tipos celulares se encuentran distantes (Defaweux et al., 2005). Una de las teorías más aceptadas es que las fibras del sistema nervioso periférico actúen como intermediarias de este transporte. Así, por ejemplo, las CDF localizadas en las áreas ricas en células B del bazo (o de cualquier otro órgano linfóide), sean capaces de interaccionar con las fibras nerviosas que lo inervan (Figura 5). De acuerdo con esta teoría, Prinz y colaboradores han demostrado que en función de la distancia existente entre las CDFs infectadas y los nervios periféricos la neuroinvasión se da más tardía o tempranamente (Prinz et al., 2003a; Beekes and McBride, 2000).



**Figura 5: Representación de los posibles mecanismos utilizados por la molécula del prión infeccioso para transportarse desde las CDF hasta el sistema nervioso central, utilizando como intermediarias a las fibras nerviosas que inervan los órganos linfoides. Fuente (Mabbott and MacPherson, 2006). AC: Arteriola Central.**

No se puede descartar que esta transferencia pueda darse también a través de exosomas liberados por las CDFs. Los exosomas son vesículas secretadas desde la membrana plasmática que han sido descritos como transmisores de patógenos intracelulares de célula a célula. Además de en CDF, los exosomas han sido descritos en muchos tipos celulares tales como células dendríticas, linfocitos, reticulocitos, células epiteliales, etc. (Denzer et al., 2000; Fevrier et al., 2004). Tienen un diámetro aproximado de 30-100nm, son de origen endocítico y están enriquecidos en proteína (Thery et al., 2002). La función de los exosomas no se conoce con exactitud, pero posiblemente sea la eliminación de proteínas degradadas endosomal o lisosomalmente. Se han descrito como potentes inmunoestimuladores así como buenos transportadores

de antígenos de célula a célula. Con estas características, los exosomas han sido descritos como los “caballos de troya” en la transmisión de muchos patógenos, tales como el VIH en el que se ha descrito que utiliza los exosomas para la replicación y propagación del mismo (Gould et al., 2003; Nguyen et al., 2003). Es conocido que los exosomas poseen proteínas de anclaje por glicofosfatidil-inositol (GPI), incluida la PrP<sup>C</sup> y en un estudio reciente se ha demostrado la capacidad de los exosomas de liberar la forma infecciosa PrP<sup>Sc</sup> (Fevrier et al., 2004). De este modo se puede hipotetizar la posible implicación del exosoma como “caballo de troya” del agente infeccioso liberándose desde una célula infectada a una no infectada.

Una vez alcanzado el sistema nervioso periférico, el PrP<sup>Sc</sup> puede llegar al SNC por muy diversas rutas, dependiendo entre otras, de la cepa de PrP<sup>Sc</sup> y de la especie animal de que se trate. Así, en rumiantes desafiados oralmente con *scrapie* se ha demostrado que el agente causal del es capaz de alcanzar el SNC a través del sistema nervioso entérico, utilizando tanto fibras nerviosas del sistema simpático y parasimpático (Baldauf et al., 1997; Beekes et al., 1996; Beekes and McBride, 2000; Beekes et al., 1998; McBride and Beekes, 1999; McBride et al., 2001; Heggebo et al., 2003; van Keulen et al., 2000). Esta vía de entrada al SNC a través del sistema nervioso entérico ha sido descrita además en mulas infectadas con la enfermedad debilitante crónica (Sigurdson et al., 2001) y en humanos afectados por la nvCJD (Haik et al., 2003).

De una manera totalmente independiente a lo descrito hasta ahora, se ha postulado la posibilidad de que la transferencia hacia el sistema nervioso central sea vía hematológica. De este modo, los linfocitos y macrófagos entrarían en contacto con el agente en los órganos del sistema linfático para llegar a la sangre a través de la vía linfática. Una vez allí, seguirían el torrente sanguíneo hasta el SNC y atravesarían la barrera hematoencefálica por medio de los macrófagos perivasculares y células de la glía limitantes (Dealler, 1997; Maignien et al., 1999). Como apoyo a esta hipótesis existen trabajos que demuestran la presencia de PrP<sup>Sc</sup> en las leptomeninges y en las células endoteliales de los vasos sanguíneos del plexo coroideo (Jeffrey et al., 1998; Lemaire-Vieille et al., 2000).

## **1.7. Terapias y profilaxis frente a las enfermedades causadas por priones.**

En humanos, las enfermedades causadas por priones tienen tiempos de incubación muy largos (desde años a décadas), una fase clínica muy breve (meses), no existe un diagnóstico preclínico y la enfermedad es de desenlace fatal.

Un gran problema de las EETs, junto a todas las enfermedades neurodegenerativas, es que la posible terapia debe dirigirse necesariamente al sistema nervioso central, lo cual supone que debe ser capaz de atravesar la barrera hematoencefálica.

En las situaciones en que la infección por priones se produce periféricamente (infección oral o intraperitoneal), la utilización de terapias y/o profilaxis podrían tener más probabilidades de éxito si se aplican en etapas tempranas de la infección, antes de que el agente infeccioso llegue al SNC.

Así pues, resulta necesario desarrollar herramientas profilácticas contra estas enfermedades, a pesar de que el número de afectados sea relativamente bajo (aproximadamente 160 personas han sido diagnosticadas con la nvCJD en el mundo hasta el momento), sobre todo pensando en el número de personas asintomáticas potencialmente infectadas (la infección puede durar décadas) (Trevitt and Collinge, 2006).

En lo que se refiere a las otras etiologías de la enfermedad (iatrogénica, familiar y esporádica), no necesita justificación el desarrollo de vacunas o medidas profilácticas capaces de proteger o paliar la enfermedad a grupos de riesgo.

### **1.7.1. Bloqueo de los componentes implicados en la conversión de PrP<sup>C</sup> a PrP<sup>Sc</sup>.**

Cada día existen más evidencias de que la proteína infecciosa por si misma en un sistema *in vivo* no resulta directamente neurotóxica, necesitando de entre otros factores, de la presencia de la PrP<sup>C</sup> (los ratones PrPKO no se infectan) y además, no siempre parece existir una estrecha correlación entre los depósitos de PrP<sup>Sc</sup> y la severidad de la enfermedad (Bueler et al., 1994; Collinge et al., 1995; Hill et al., 2000; Hsiao et al., 1990; Lasmezas et al., 1997; Mallucci et al., 2003; Medori et al., 1992). Todos estos datos parecen sugerir que más que la acumulación del PrP<sup>Sc</sup> *per se*, la clave



de la patogénesis de las EETs reside en el proceso de conversión de PrP<sup>C</sup> a PrP<sup>Sc</sup>. Así pues, cualquier estrategia terapéutica que pretenda ser eficaz frente a las EETs debería ir dirigida a frenar éste. Finalmente, para validar una buena terapia o profilaxis resulta fundamental tener en cuenta la cepa de prión de que se trata, la especie afectada y la ruta de inoculación del agente infeccioso, dado que la eficacia de ésta dependerá de estas tres variables.

En la bibliografía existen muchas líneas de investigación abiertas dirigidas a generar una terapia efectiva frente al prión. Entre las más prometedoras, nos encontramos con la utilización de: aptámeros de ARN que bloquean la PrP<sup>C</sup> y consecuente producción de PrP<sup>Sc</sup> *de novo* (Proske et al., 2002; Rhie et al., 2003); sustancias que inhiben las cascadas de señalización intracelular en que la PrP<sup>C</sup> se ve implicada (Bate et al., 2004; Ertmer et al., 2004; Nordstrom et al., 2005; Shaked et al., 2003) y sustancias químicas que interfieren directa o indirectamente en el proceso de conversión de PrP<sup>C</sup> a PrP<sup>Sc</sup>. Entre estas sustancias encontramos el rojo congo (Caughey and Race, 1992), amphotericina B (Pocchiari et al., 1987), antraciclinas (Tagliavini et al., 1997), polianiones sulfatados (Caughey and Raymond, 1993), porfirinas (Priola et al., 2000), poliaminas (Supattapone et al., 2001), péptidos “rompedores” de hojas  $\beta$  (Soto et al., 2000) y curcumina (Caughey et al., 2003). A pesar de que ninguna de estas estrategias ha resultado lo suficientemente efectiva para ser actualmente empleada como una terapia anti-prión (Aguzzi and Sigurdson, 2004), muchas resultan lo suficientemente prometedoras como para seguir investigando sobre ellas.

Al igual que los ratones “artificialmente” privados del gen del prión (PrPKO), son resistentes a la enfermedad, existen “variantes naturales” del prión resistentes a la transformación a forma infecciosa. Así, en ovejas y en humanos han sido descritas dos mutaciones naturales en el gen que codifica para la proteína PrP, Q167R y Q218K, respectivamente que confieren resistencia frente a *scrapie* y CJD (Goldmann et al., 1994; Shibuya et al., 1998). La expresión transgénica de estas mutaciones en ratones los hace resistentes al desafío con priones (Perrier et al., 2002). Actualmente se está estudiando la posibilidad de seleccionar animales (ovejas y vacas) genéticamente resistentes a la enfermedad para evitar futuras epidemias. Del mismo modo, la futura aplicabilidad de estas mutaciones en protocolos de terapia génica se ha barajado como posible herramienta de futuro para luchar contra las enfermedades causadas por priones.

Uno de los resultados más esperanzadores en este aspecto procede de experimentos de bloqueo de la PrP<sup>C</sup> y la consecuente imposibilidad de ser transformada

por la isoforma infecciosa, utilizando ratones transgénicos que expresan además su proteína normal, la proteína PrP murina completa fusionada a la porción Fc de la IgG<sub>1</sub> humana (ratones PrP-Fc<sub>2</sub>), incapaz de ser transformada a PrP<sup>Sc</sup> (Meier et al., 2003). El notable retraso en los tiempos de incubación en los ratones transgénicos se debe posiblemente a una competencia entre la PrP<sup>C</sup> y la PrP fusionada por unirse a la isoforma infecciosa. A pesar de lo prometedor de estos resultados, sería necesario realizar estudios en los que se demuestre el efecto del transgen utilizando la PrP fusionada a Fc<sub>2</sub> como un producto biofarmacéutico

### **1.7.2. Estrategias basadas en la modulación del sistema inmunológico.**

Independientemente de las estrategias descritas hasta el momento, una línea de trabajo que resulta muy prometedora es la relacionada la modulación del sistema inmunológico con el fin de conseguir estrategias terapéuticas y/o profilácticas frente a estas enfermedades, campo en el que el trabajo aquí presentado se encuadraría.

Ya en el año 1973 Porter y colaboradores describieron las enfermedades producidas por priones como enfermedades que cursaban sin una respuesta inmunológica humoral detectable en el huésped afectado (Porter et al., 1973). A pesar de que a lo largo de esta introducción se ha abordado este tema, cabe recordar que a pesar de que la enfermedad viene producida por un antígeno propio, lo que dificulta su reconocimiento por parte del sistema inmunológico, al menos en fases tempranas de la infección, existe una clara respuesta inflamatoria (Baker et al., 2004). A día de hoy, existe una potente línea de investigación encaminada a estimular el sistema inmunológico del huésped contra el prión con el objetivo de conseguir estrategias terapéuticas o profilácticas eficaces contra estas enfermedades.

De entre las estrategias inmunoterapéuticas y/o inmunopreventivas utilizadas hasta el momento, cabe destacar: la depleción células dendríticas foliculares, la estimulación del sistema inmunológico innato y la utilización de anticuerpos específicos para inhibir la progresión de la enfermedad.

#### **1.7.2.1. Depleción de las células dendríticas foliculares.**

Ya ha sido comentado anteriormente el importante papel que desempeñan las células foliculares dendríticas en el desarrollo de las enfermedades causadas por priones, tratándose de uno de los lugares principales de replicación del prión.

La linfotoxina de membrana (LT  $\alpha_1\beta_1$ ) y el factor de necrosis tumoral (TNF  $\alpha$ ) generados por las células B son necesarios en la diferenciación y maduración de las CDFs (Brown et al., 1999; Mabbott et al., 2000b) y el bloqueo en cualquiera de estas citoquinas da lugar a un incremento en el tiempo de incubación de la enfermedad. Este hecho hizo pensar en la posibilidad de deplecionar temporalmente las CDFs como posible terapia en fases tempranas de una infección por priones. Con este objetivo en mente, se administró una inmunoglobulina fusionada al receptor de la linfotoxina beta (LT  $\beta$ -R-Ig), tratamiento capaz de bloquear la maduración de las CDFs inhibiendo la cascada de señalización que conduce a la expresión de estas linfotoxinas. Curiosamente, el efecto del tratamiento de ambos dependía del momento y la ruta de administración. Así por ejemplo, si la proteína de fusión se administraba tras el desafío intraperitoneal de *scrapie* (en una fase temprana), los animales quedaban protegidos (Mabbott et al., 2000a; Mabbott et al., 2003; Montrasio et al., 2000), mientras que si el tratamiento se aplicaba antes del desafío intraperitoneal, la protección era total para algunos animales mientras que en otros únicamente retrasaba la aparición de la enfermedad (Mabbott et al., 2003). Por otro lado, el tratamiento con LT  $\beta$ -R-Ig inmediato tras el desafío oral con *scrapie* evitaba totalmente la aparición de la enfermedad, no observándose depósitos de PrP<sup>res</sup> en el cerebro de los animales (Mabbott et al., 2003). Sin embargo, el tratamiento administrado 14 días post desafío oral no tuvo ningún efecto en el desarrollo de la enfermedad (Mabbott et al., 2003), lo cual indicaría que la entrada del prión en el sistema neuronal ocurre rápidamente tras el desafío oral. Finalmente, el desafío a través de escarificaciones de la piel dio como resultado una mejora del tratamiento cuando éste era administrado previo al desafío (similar a la ruta intraperitoneal) (Mohan et al., 2005a).

A pesar de las limitaciones del método, este tipo de terapias podrían resultar de utilidad en el futuro para el tratamiento de aquellos individuos conscientes de haber sido infectados o como método preventivo para el personal con alto riesgo de ser infectados (enfermeros, etc.). Del mismo modo, sería interesante explorar las posibilidades de esta metodología para prevenir el desarrollo de encefalopatías hereditarias.

#### 1.7.2.2. Estimulación del sistema inmunológico innato.

La respuesta inmunológica innata actúa como una primera barrera de agresiones del exterior, bien consecuencia de la infección con un patógeno (virus, bacteria,



parásitos...) o bien de cualquier otra naturaleza como podría la exposición a un adyuvante o a otras sustancias inmunoestimuladoras. Varios son los actores que intervienen en la respuesta innata, jugando un papel predominante las células dendríticas, los macrófagos y las células NK (células asesinas naturales), así como quimiocinas y chemocinas que éstas secretan moduladores químicos responsables finales de la acción de defensa (Byrne and Halliday, 2002; Foti et al., 2006; Young and Ortaldo, 2006). De entre las quimiocinas más relevantes para el sistema inmunológico innato, nos encontramos con los interferones, citoquinas que han demostrado ser capaces de inhibir, por ejemplo, evoluciones virales eficientemente. Sin embargo, el tratamiento con interferón o con estimuladores de interferón en ratones infectados con *scrapie* no parece tener un efecto en la progresión de la enfermedad (Allen and Cochran, 1977; Field et al., 1969; Gresser et al., 1983; Gresser and Pattison, 1968; Worthington, 1972). Estos mismos resultados se reprodujeron en monos infectados con CJD, *scrapie* y *kuru* (Amyx et al., 1984).

La administración de citidil-guanil oligodeoxinucleótidos (CpGs), concretamente de CpG 1826 es conocida por su estimulación de la respuesta inmunológica innata en mamíferos (Lipford et al., 1998). En ratones infectados periféricamente con *scrapie* se ha observado un leve incremento en los tiempos de incubación cuando CpG 1826 fue administrado inmediatamente tras la infección y diariamente durante 4 días. Cuando este tratamiento fue prolongado durante 3 semanas, la aparición de la sintomatología se retrasó aproximadamente 149 días (Sethi et al., 2002). El mecanismo por el cual se produce este retraso no es conocido, los autores hipotetizan con la posibilidad de que tras el desafío con *scrapie* y la administración de CpG 1826 se generan anticuerpos frente al prión responsables de este retraso (Sethi et al., 2002). Sin embargo, se ha observado que la administración repetida de CpGs da lugar a la destrucción de los folículos linfoides (lugares de amplificación del prión) y una consecuente inmunosupresión, hechos que pueden explicar el efecto protector del tratamiento (Heikenwalder et al., 2004). Así pues, a día de hoy la utilización de CpGs como terapia anti prión es inviable dados sus efectos tóxicos asociados a la administración repetida. Debe tenerse en cuenta que uno de los efectos del tratamiento con CpGs es una expansión masiva de macrófagos y células dendríticas. Ambos tipos celulares pueden jugar un importante papel en la degradación o secuestro de la proteína infecciosa (Beringue et al., 2000) y, por tanto, dar lugar al retraso de la enfermedad.

Tal y colaboradores han descrito que el adyuvante de Freund completo, magnífico estimulador del sistema inmunológico innato, es capaz de retrasar ligeramente los tiempos de incubación de la enfermedad en ratones tras el desafío intraperitoneal o intracraneal con *scrapie* (Tal et al., 2003).

### 1.7.2.3. Terapias basadas en anticuerpos

Diversos autores han descrito la capacidad de generar anticuerpos frente a la proteína del prión utilizando distintas estrategias. Se han generado en ratones normales y PrPKO inmunizando con priones purificados (Bendheim et al., 1984) y con fibras asociadas a *scrapie* (SAFs) (Kascsak et al., 1987). Más recientemente, se ha descrito la utilización de proteína recombinante del prión como una buena estrategia para generar anticuerpos, tanto en ratones PrPKO (Beringue et al., 2003; iKhalili-Shirazi et al., 2005; Korth et al., 1997; Krasemann et al., 1996; White et al., 2003; Williamson et al., 1996) como en ratones normales (Gilch et al., 2003; Schwarz et al., 2003; Sigurdsson et al., 2002; Souan et al., 2001).

Anticuerpos	Metodología de obtención del anticuerpo	Residuos de reconocimiento. Especie	Efecto	Tipo celular en el que se ensaya el efecto.	Autor
Fragmentos recombinantes Fab. D18 y D13.	Metodología recombinante.	D13: 95-103 D18: 132-156 Humano.	Inhiben la formación PrP <sup>Sc</sup> .	Línea celular ScN2a	(Peretz et al., 2001)
SAF 34 y SAF61	Inmunización ratones PrPKO con fibras asociadas a <i>scrapie</i> (SAF).	SAF 34: 59-89 SAF 61: 144-152 Humano	Previenen la interacción PrP <sup>C</sup> -PrP <sup>Sc</sup>	Células de neuroblastoma.	(Perrier et al., 2004)
ICSM 35, ICSM37 .	Inmunización ratones PrPKO con PrP recombinante humana.	ICSM 35: 93-105 ICSM 37: 97-107	Inhiben acumulación PrP <sup>Sc</sup> .	Células Rov	(Beringue et al., 2004)
Anticuerpos policlonales.	Inmunización ratones con PrP recombinante dimérica murina.		Inhiben la formación de PrP <sup>Sc</sup> de novo.	Línea celular ScN2a.	(Gilch et al., 2003)
Anticuerpos policlonales.	Inmunización de ratones PrPKO con PrP <sup>Sc</sup> .		Bloquean la PrP <sup>C</sup> .	Línea celular ScN2a	(Kim et al., 2004)
Anticuerpos policlonales.	Inmunización de ratones PrPKO con péptidos de PrP, PrP recombinante o con fibras asociadas a <i>scrapie</i> (SAF).		Bloquean la PrP <sup>C</sup> .	Líneas celulares N2a y ScN2a. Células Rov9.	(Feraudet et al., 2005)
scFv 6H4	Metodología recombinante.		Reducción PrP <sup>Sc</sup>	Células RD-4	(Donofrio et al., 2005)
KDEL-scFv 8H4 y KDEL-scFv 8F9	Metodología recombinante.		Retención PrP <sup>C</sup> en retículo endoplasmático	Células PC12	(Cardinale et al., 2005)

**Tabla 2:** La utilización de anticuerpos frente al prión en estudios *in vitro* ha demostrado efectos beneficiosos. En esta tabla se representan algunos ejemplos obtenidos de la literatura.

Los primeros indicios del potencial terapéutico de la utilización de estos anticuerpos vinieron de estudios *in vitro* en los que se observó una reducción de dos logaritmos de un inóculo infeccioso de *scrapie* tras incubación con un anticuerpo policlonal anti prión (Gabizon et al., 1988). Tras este prometedor estudio varios autores han utilizado anticuerpos para ver su efecto en diferentes líneas celulares *in vitro*. Por ejemplo, el anticuerpo 6H4, que reconoce tanto la PrP bovina (residuos 144-152) como de otras especies (Korth et al., 1997), es capaz de inhibir la acumulación de PrP<sup>Sc</sup> en células infectadas con *scrapie* (Enari et al., 2001). Del mismo modo, otros autores describen los efectos beneficiosos de la utilización de anticuerpos frente a prión en estudios *in vitro* utilizando distintas cepas de prión y distintas líneas celulares, mostrando el posible gran potencial *in vivo* de esta estrategia. Algunos de estos estudios se enumeran en tabla 2.

A pesar de lograr efectos beneficiosos *in vitro*, algunos modelos no han resultado ser efectivos *in vivo* (Trevitt and Collinge, 2006); (Aguzzi and Sigurdson, 2004). A continuación, se hará un repaso a los resultados más prometedores obtenidos *in vivo* bien mediante transferencia pasiva de anticuerpos o bien mediante inmunización activa.

### ***Transferencia pasiva de anticuerpos.***

La administración periférica del anticuerpo ICSM 18 (que reconoce el epítipo 144-152 de la PrP humana) ó del anticuerpo ICSM 35 (que reconoce el epítipo 94-105 de la PrP humana) a elevadas dosis durante 7 días tras el desafío intraperitoneal con *scrapie*, previene la aparición de la enfermedad. Sin embargo, el tratamiento no es efectivo si se inicia en el momento de la aparición de la sintomatología clínica, o bien si el desafío se realiza mediante la ruta intracraneal (White et al., 2003).

Por otro lado, la administración periférica de los anticuerpos capaces de reconocer los epítopos 34-52 (8B4) y 175-185 (8H4) de la PrP murina tras la infección intraperitoneal con *scrapie*, fueron capaces únicamente de retrasar un poco la aparición de la infección (Sigurdsson et al., 2003).

A pesar de los aparentes efectos beneficiosos de la administración pasiva de anticuerpos, recientemente se ha descrito que si éstos se administran directamente a nivel del hipocampo y a una concentración elevada (1mg/ml), pueden provocar la

apoptosis de neuronas en cerebelo e hipocampo, observable a las 24 horas post-administración. Cabe resaltar que éste efecto se pudo conseguir únicamente tras la administración de anticuerpos monoclonales que reconocen el epítipo comprendido entre los aminoácidos 95 y 105 de la secuencia de la PrP humana y no con otros monoclonales que reconocen otras partes de la proteína (Solforosi et al., 2004). Este resultado indica probablemente que como consecuencia de la unión del anticuerpo a este dominio de la PrP<sup>C</sup>, se bloquea alguna vía de señalización esencial para la supervivencia neuronal.

Claramente, la transferencia pasiva de anticuerpos puede ser una buena herramienta de futuro para luchar contra las enfermedades priónicas. Sin embargo, para su futura aplicabilidad en humanos será necesario realizar estudios muy exhaustivos que descarten posibles efectos deletéreos.

### ***Inmunización activa contra el prión***

A pesar de que a lo largo de una infección con priones no se generan anticuerpos detectables frente al prión, acabamos de comprobar que se pueden generar anticuerpos específicos de muy diversas maneras, pudiendo en algún caso ser eficientes contra la enfermedad (Aguzzi and Sigurdson, 2004). Existen una serie de puntos críticos en la generación de anticuerpos frente a la PrP<sup>C</sup>, entre ellos la tolerancia que presentan los animales frente a la PrP como inmunógeno al tratarse de un antígeno propio (Aucouturier and Carnaud, 2002; Aucouturier et al., 2000; Berg, 1994; Heppner and Aguzzi, 2004; Porter et al., 1973; Williamson et al., 1996). Por otro lado, dado que la PrP se expresa en muchos tipos celulares (Cashman et al., 1990; Manson et al., 1992) podría ser que la generación de anticuerpos frente a la PrP<sup>C</sup> desencadenara con severidad una enfermedad autoinmune. Finalmente, parece complicado que los anticuerpos específicos frente a PrP sean capaces de atravesar la barrera hematoencefálica en concentraciones terapéuticas de manera que pueda hacer su efecto terapéutico en el sistema nervioso central. A pesar de ello, en los últimos años, diversos autores han descrito los efectos beneficiosos de la inmunización activa en ratones con proteína de prión o péptidos en ratones.

Sigurdsson y colaboradores han descrito un incremento de un 10% en el tiempo de incubación de la enfermedad en ratones inmunizados con proteína recombinante murina (residuos 23-230). Este incremento se observa únicamente cuando la

inmunización se realiza dentro de las 14 semanas anteriores al desafío con *scrapie* adaptado a ratón. Ha sido descrita también una correlación paralela entre el título de anticuerpos y el incremento en el tiempo de incubación, mientras que no se observaron diferencias en la histopatología y en los niveles de PrP<sup>res</sup> entre los animales tratados y los controles en las fases terminales de la enfermedad (Sigurdsson et al., 2002).

La inmunización activa con el péptido de príon comprendiendo los residuos 105-125 de la PrP murina incrementa el tiempo de incubación en ratones PrP infectados oralmente con *scrapie*, mientras que esta misma inmunización con el polipéptido que comprende los residuos 90-230 no tiene ningún efecto de retraso en la enfermedad. Los anticuerpos generados tras la inmunización con el fragmento 90-230 reconocen un epítipo de la región 159-188 de la proteína priónica. Los autores proponen que mientras que éstos anticuerpos resultan ineficaces frente a la enfermedad, los anticuerpos que reconocen las regiones 105-125 y/o 144-152 de la proteína priónica son capaces de retrasarla eficazmente (Schwarz et al., 2003).

Rosset y colaboradores describieron en el año 2004 la inducción no únicamente de una respuesta humoral, sino también de una respuesta celular en ratones C57BL/6J6OlaHsd mediante la utilización de péptidos de príon junto al inmunoestimulador CpG. En este estudio fueron utilizados 3 péptidos diferentes (P98-127; P143-172 y P158-187) mezclados con CpG-1826. Los autores demostraron la inducción de células T secretoras de IFN- $\gamma$  e IL-4 y la producción de anticuerpos a distintos niveles en función del péptido utilizado. De este modo quedó patente la capacidad de inducir una respuesta inmunológica tanto humoral como celular frente a la proteína del príon utilizando un protocolo de vacunación capaz de romper la barrera de la tolerancia frente al príon (Rosset et al., 2004).

La administración oral de *Salmonella typhimurium* expresando la proteína priónica murina antes del desafío oral con *scrapie* da lugar a un incremento en los tiempos de incubación en los animales, así como una disminución del 70% en la incidencia de la prionopatía. En los animales supervivientes no se observaron histológicamente los signos característicos de la enfermedad en descripciones de hasta 500 días post infección. En los animales que sí manifestaron la enfermedad no se observaron diferencias histológicas respecto a los controles. Todos los animales de este experimento presentaron una correlación entre los niveles de IgA e IgG específicos contra el príon y los tiempos de supervivencia (Goni et al., 2005).

Magri y colaboradores han descrito recientemente la inmunización de hámsters con péptidos de la región N-terminal y de la región central de la proteína priónica. El régimen de inmunización fue de tres veces antes del desafío intraperitoneal con *scrapie* y cinco veces tras el mismo. Pudieron observar un incremento moderado pero no estadísticamente significativo de los tiempos de supervivencia en los animales tratados, una disminución de la espongiosis y de los depósitos de PrP<sup>Sc</sup> y una disminución en los niveles de la citoquinas pro inflamatorias Il-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  (Magri et al., 2005).

La expresión transgénica en ratones de la cadena  $\mu$  de 6H4, anticuerpo eficiente contra la infección in vitro con *scrapie* (Enari et al., 2001), dio lugar a altos títulos de anticuerpos en sangre protegiendo a los animales de la infección intraperitoneal con *scrapie* (Heppner et al., 2001b).

Muy recientemente, Ishibashi y colaboradores han presentado una serie de resultados en los que se comparan los efectos de la inmunización, en ratones, con proteína recombinante de prión bovina, murina y de oveja. En este trabajo se observa un retraso significativo en la aparición de la sintomatología únicamente en los ratones inmunizados con la proteína recombinante bovina, mientras que la inmunización con proteína recombinante murina no tuvo ningún efecto de retraso tras la infección intraperitoneal con priones y la inmunización con proteína de oveja tuvo efectos variables. Los mecanismos implicados en dicha protección no han sido aún esclarecidos (Ishibashi et al., 2006).

Todos estos resultados, aunque preliminares, resultan muy prometedores a la hora de imaginarse en un futuro la existencia de una inmunoterapia efectiva frente al prión (Polymenidou et al., 2004).

### **1.7.3. Presente y futuro de la inmunoterapia frente a priones**

En el momento actual, no existen terapias efectivas contra las enfermedades producidas por priones, siendo éstas mortales en el 100% de los casos.

En el caso de la nueva variante de CJD (nvCJD) hasta la fecha ha habido 160 casos (Trevitt and Collinge, 2006; Zarranz, 2006). Desde los años de crisis de EEB se han tomado medidas muy restrictivas respecto al control cárnico de consumo humano, por tanto la probabilidad de infectarse por esta vía es en la actualidad mínima. Sin embargo, debe asumirse que un número desconocido de personas pueden encontrarse afectadas subclínicamente por EEB con anterioridad a la aplicación de estas medidas y

que un porcentaje de las mismas puede desarrollar la nvCJD e infectar mediante diversas vías a otros individuos.

Respecto a las enfermedades causadas por priones de origen hereditario, no existen profilaxis capaces de evitar en los individuos afectados el desarrollo de la enfermedad, pudiendo evitarse únicamente mediante un asesoramiento genético junto a un diagnóstico prenatal, que invariablemente puede ir asociado a problemas éticos.

Con todo ello, puede intuirse la necesidad de trabajar en profundidad en metodologías diagnósticas, en terapias y en profilaxis específicas frente a estas enfermedades. A pesar de que las terapias y/o profilaxis descritas en el anterior apartado son muy prometedoras, hasta el momento su eficacia se vería limitada en términos de terapia a aquellos casos de infección muy temprana o en términos de profilaxis en su aplicación a individuos portadores de mutaciones patológicas en el gen de la PrP<sup>Sc</sup>. Además, debe tenerse en cuenta que los efectos beneficiosos se han descrito en animales experimentales y que la extrapolación a ensayos humanos puede tener consecuencias no deseables. Un claro ejemplo de ello fue el tratamiento, en pacientes con Alzheimer, con una vacuna que en modelos experimentales animales tuvo resultados muy favorables y sin embargo en humanos produjo efectos de autoinmunidad dando lugar a encefalitis en algunos de los pacientes (Check, 2002; Nicoll et al., 2003).

Como ya ha sido comentado a lo largo de esta introducción, la PrP<sup>Sc</sup> debe considerarse como una proteína propia del organismo y por ello conseguir inducir una respuesta inmunológica frente a este patógeno resulta muy complicado. La búsqueda de una terapia adecuada se asemeja al caso de los tumores, cuyas células son, en muchos casos, casi idénticas a las células normales del organismo (Pardoll, 2003) y por ello son capaces de “escapar” a la respuesta inmunológica. Estas terapias deben consistir en dirigir el sistema inmunitario contra estos antígenos propios de expresión inadecuada o sobredimensionada en todas las vías posibles (humoral y celular) y de la manera más potente posible, consiguiendo de este modo romper la barrera de la tolerancia frente a ellos.

Trabajos realizados previamente entre otros (Prud'homme, 2005), en nuestro laboratorio, han permitido desarrollar estrategias de vacunación capaces de romper la barrera de tolerancia contra un antígeno propio tras la vacunación con ADN, siendo capaces de proteger incluso contra tumores (Xiang et al., 2000). La vacunación con ADN presenta muchas ventajas, entre ellas su inocuidad para el paciente, su bajo coste, su fácil producción,...manteniendo sin embargo intacta su capacidad para inducir

ambos tipos de respuesta inmunológica: humoral y celular, lo que la convierte en una estrategia ideal como posible terapia de futuro frente a las encefalopatías espongiformes transmisibles.

### 1.8. Vacunación con ADN.

La vacunación con ácidos nucleicos consiste en la inoculación *in vivo* de un ácido nucleico, normalmente en forma de ADN plasmídico, conteniendo una fase de lectura abierta (ORF) que codifica por el antígeno contra el que se quiere inducir una respuesta inmunológica y cuya expresión viene controlada por un promotor eucariótico. Tras la inmunización, el plásmido es capaz de entrar en determinadas células del individuo y tras su reconocimiento por la maquinaria intracelular, el polipéptido expresado y correctamente procesado es presentado a las células del sistema inmunológico para inducir una respuesta inmunológica completa.

La respuesta inmunológica generada, humoral y/o celular, prepara al individuo vacunado para contrarrestar una infección con el patógeno, de manera que su utilización de forma profiláctica constituye una potencial herramienta a aplicar, sobre todo en aquellas enfermedades que requieren ambas ramas de la respuesta inmunológica, como las causadas por virus (Davis and Whalen, 1995).

Un componente muy importante en las vacunas de ADN es la presencia de secuencias inmunoestimuladoras (ISS, del inglés Immunostimulatory sequences) (Pisetsky, 1996; Sato et al., 1996): CpG's, que como hemos visto previamente activan la respuesta inmunológica innata actuando como un adyuvante endógeno e independiente del antígeno. Así los CpG's son capaces de activar a los linfocitos B, promoviendo la secreción de anticuerpos, a los macrófagos y a las células dendríticas favoreciendo la presentación antigénica y provocan la sobreactivación de las células NK.

Existen multitud de ejemplos en los que la vacunación con ADN ha resultado de gran eficiencia, tanto utilizando el ratón como modelo animal (Borrego et al., 2006; Buch and Waisman, 2006; Galloway and Baillie, 2004; Orme, 2006) como grandes animales (Fuller et al., 2006; Paillot et al., 2006). Actualmente existen muchos ejemplos de vacunas de ADN frente a patógenos humanos en fase de ensayos clínicos (ver [www.dnavaccine.com](http://www.dnavaccine.com)) y, a pesar de las reticencias iniciales, las vacunas ADN han comenzado a salir al mercado para paliar problemas que afectan a la sanidad animal (Davis et al., 2001; <http://www.fortdodge.com.mx/productos/nilo.htm>).



La vacunación con ADN también ha sido ensayada como estrategia contra las enfermedades causadas por priones. Así el caso más espectacular descrito en la literatura se refiere a la protección total conseguida en ratones transgénicos bovinos tras la inmunización con una vacuna de ADN expresando la proteína bovina y una posterior infección oral con proteína infecciosa. A pesar de lo prometedor de los resultados, se desconocen absolutamente los mecanismos de protección desencadenados por la vacuna ya que no se pudo detectar ni respuesta humoral ni celular consecuencia de la vacunación (Muller et al., 2005).

Tanto en nuestro laboratorio como en otros, actualmente se está trabajando en la obtención de vectores con mayor potencial de expresión *in vivo* así como en el desarrollo de nuevas estrategias que permitan optimizar tanto la presentación antigénica de la vacuna como la respuesta inmunológica inducida, muchas de las cuales han demostrado ser eficaces frente a otros patógenos (Donnelly et al., 2000; Hung and Wu, 2003; Leifert et al., 2004; Rodriguez and Whitton, 2000; Shedlock and Weiner, 2000). Conociendo los mecanismos implicados en protección frente a priones permitiría en un futuro diseñar una vacuna a la carta, capaz de inducir aquella/s arma/s de la respuesta inmunológica que resulte/n eficiente/s en protección, evitando posibles efectos adversos.

### **1.8.1. Las rutas de presentación antigénica.**

Mientras que las células B son capaces de reconocer antígenos extracelulares en muchos casos en su forma soluble y nativa, los linfocitos T requieren que el antígeno sea procesado intracelularmente a pequeños péptidos de 9-24 aminoácidos, que se conocen como epítomos T. Estos epítomos son presentados en la superficie de las células presentadoras de antígeno (CPA), junto con una serie de glicoproteínas que forman parte del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Existen dos clases de complejos CMH denominados CMH clase I y CMH clase II que definen las dos vías de presentación antigénica: Clase I y Clase II. Así, cada uno de los complejos mayores de histocompatibilidad únicamente es capaz de presentar el epítomo al que se une, a un único tipo de célula T a través de receptores específicos; las células TCD8<sup>+</sup> reconocen epítomos presentados por el CMH clase I mientras que las células TCD4<sup>+</sup> reconocen epítomos presentados por CMH clase II.

#### 1.8.1.1. Presentación antigénica por la vía del CMH de clase I.

Las moléculas de histocompatibilidad de clase I son muy ubicuas y se expresan en la mayoría de las células somáticas, de modo que las células TCD8<sup>+</sup> son capaces de reconocer epítomos en gran cantidad de células. Aunque clásicamente se ha considerado que las moléculas de CMH clase I presentan epítomos de proteínas endógenas, por ejemplo producidas por virus, a día de hoy se ha demostrado que las células dendríticas, son capaces de presentar con la misma eficiencia antígeno extracelular mediante un mecanismo que se conoce como presentación cruzada (Moore et al., 1988; Rock and Clark, 1996; Watts, 1997; Whitton et al., 1999; Zinkernagel, 2002).

En ambos casos, las proteínas han de ser degradadas a pequeños péptidos de 9-11 aminoácidos previo a su presentación. Aunque varios son los orgánulos celulares y las enzimas que se han visto implicadas en el proceso, el proteasoma es el orgánulo implicado principalmente en la degradación de proteínas a péptidos susceptibles de entrar en la ruta de clase I. En la mayoría de las ocasiones, el sustrato del proteasoma proviene de proteínas mal plegadas o anormales y que mediante la maquinaria de ubiquitinación, son marcadas para su rápida eliminación en el proteasoma. El proceso de ubiquitinación comienza con la unión de un residuo de ubiquitina a la proteína “anormal”, que a su vez desencadena una cascada de uniones de nuevos residuos de ubiquitina que finaliza con la entrada de la proteína poliubiquitinada en el proteasoma y su degradación a pequeños péptidos, susceptibles de ser transportados al retículo endoplasmático (RE) utilizando los transportadores TAP. Una vez en el RE, el péptido específico se unirá a la molécula de Clase I con la que viajará hasta la superficie celular para presentarse a las células T-CD8<sup>+</sup> (Figura 6).

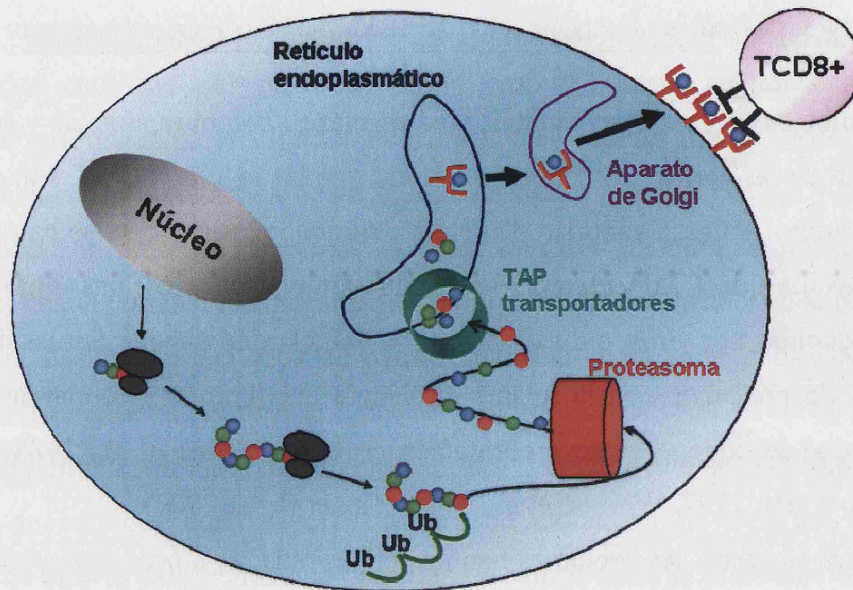


Figura 6: Esquema de la vía de presentación antigénica de clase I.

#### 1.8.1.2. Presentación antigénica por la vía del CMH de clase II.

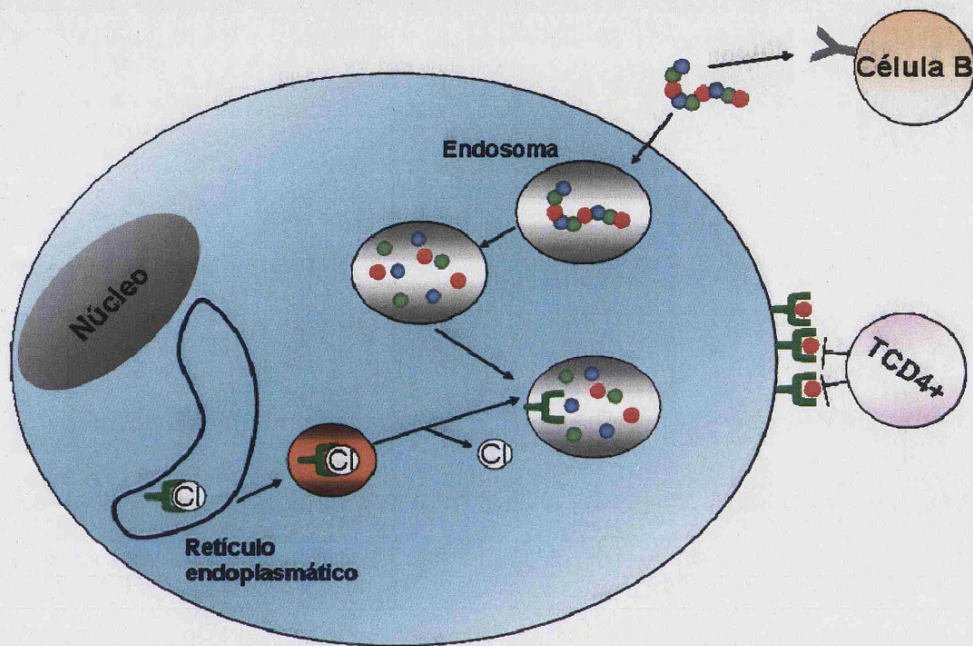
Las moléculas de histocompatibilidad de clase II son expresadas por células concretas, la mayoría, células presentadoras de antígeno (CPA). De nuevo, aunque la mayoría de las moléculas de CMH clase II presentan epítopos de proteínas exógenas procedentes del medio extracelular, como por ejemplo tras la infección con una bacteria extracelular, se ha demostrado presentación en Clase II de forma endógena (Adorini et al., 1991; Bonifaz et al., 1999; Calin-Laurens et al., 1992; Moreno et al., 1991; Oxenius et al., 1997; Parra-Lopez et al., 1997; Rodriguez and Whitton, 2000).

Sea cual fuere la procedencia del antígeno, previo a su presentación en clase II requiere ser degradado pequeños péptidos (normalmente de unos 20 aminoácidos) por proteasas ácidas.

Mientras las moléculas de CMH de clase II se encuentran en el retículo endoplasmático, se encuentran unidas a una proteína denominada cadena invariante en el lugar de unión al péptido, lo que evita su unión a péptidos inespecíficos como los que han de ser presentados por las moléculas de clase I (Figura 7). De este modo, la cadena invariante únicamente dejará su lugar al péptido específico, en los endosomas tardíos. Finalmente, aquellos péptidos con mayor afinidad por la molécula de CMH I se unirán a ella para ser transportados a la membrana plasmática para interaccionar con las células TCD4<sup>+</sup>.



Una variante muy elegante de presentación antigénica por clase II se produce en las células B de memoria, capaces de captar al antígeno de una manera específica mediante su reconocimiento a través de la inmunoglobulina (anticuerpo) apropiada. Tras su internalización y procesamiento, los epítomos apropiados se presentan junto con las moléculas de clase II, para asegurar la activación únicamente de las células TCD4<sup>+</sup> específicas, que aseguren su propia supervivencia.



**Figura 7: Esquema de la vía de presentación antigénica de clase II. CI: Cadena invariante.**

Las CPAs difieren del resto de células somáticas en su expresión constitutiva de CMH clase II, en su capacidad de dirigir la presentación antigénica por clase I o clase II y finalmente en que son las únicas células capaces de activar las células T naïve (del inglés, células T indiferenciadas).

Muchos laboratorios, entre ellos el nuestro, han explotado el conocimiento que de la presentación antigénica se posee, con el objetivo de diseñar vacunas más eficientes a la hora de presentar el antígeno al sistema inmunológico y por tanto más eficaces a la hora de inducir una respuesta inmunológica óptima. A continuación se describen las más prometedoras.

### **1.8.2. Estrategias de potenciación de la presentación antigénica.**

En los siguientes apartados se hará una breve revisión de algunas de las estrategias utilizadas por diversos grupos para lograr una potenciación en la presentación antigénica.

#### **1.8.2.1. Potenciación de la respuesta T-CD8<sup>+</sup> (citotóxica) tras la vacunación optimizando la presentación antigénica por clase I del antígeno vacunal.**

Una de las primeras evidencias que demostraban la importancia de optimizar la presentación antigénica en clase I de una vacuna a la hora de potenciar la respuesta T citotóxica (CTL) mediada por células T-CD8<sup>+</sup> provino de la vacunación con lo que se bautizó con el nombre de minigenes, pequeñas ORFs que codifican en este caso por pequeños epítomos CTL de entre 9 y 11 aminoácidos (Whitton et al., 1989). La gran ventaja del método reside en que una vez expresados intracelularmente, no precisan de un procesamiento adicional en compartimentos celulares específicos, siendo transportados directamente mediante los transportadores TAP al retículo endoplasmático, donde se unen a las moléculas de histocompatibilidad de clase I para ser posteriormente transportados a la superficie de la célula donde van a ser reconocidos por células T-CD8<sup>+</sup> a través de un receptor específico de células T (TCR).

Desde entonces y hasta el día de hoy, la capacidad protectora de los minigenes ha sido claramente demostrada en multitud de sistemas, tanto virales como no virales (Del Val et al., 1991; Klavinskis et al., 1990; Lode et al., 2004).

A pesar de que la inmunización con vacunas poliepitópicas, expresando varios epítomos en tándem en forma de minigenes ha demostrado ser también eficiente a la hora de inducir una respuesta inmunológica frente a cada uno de ellos (Thomson et al., 1996; Thomson et al., 1995; Whitton et al., 1993; Woodberry et al., 1999), el hecho de que este tipo de construcciones requieran algún tipo de procesamiento intracelular para ser presentados a las células T, explica que su eficacia difiera dependiendo del epítomo incorporado a la vacuna (Anton et al., 1997). Con el objetivo de optimizar la presentación de cada uno de los epítomos presentes en una vacuna poliepitópica, algunos autores apuestan por introducir pequeños espaciadores entre ellos que faciliten su procesamiento por parte de la maquinaria de degradación celular (Leachman et al., 2002).

La utilización de minigenes en protocolos de vacunación se ha extendido por supuesto a la vacunación con ADN (An and Sette, 1999; Rodriguez et al., 1997; Suhrbier, 1997), generalmente con resultados muy prometedores (Thomson et al., 1998b). Utilizando este método, Ciernik y colaboradores describieron una nueva estrategia de vacunación con minigenes que optimizaba aún más la presentación en clase I y que consistía en fusionar a un epítipo CTL tumoral, una señal de transporte al retículo endoplasmático (Rapoport, 1992), y que mejoraban los niveles de protección frente al tumor (Ciernik et al., 1996). Se facilitaba así su presentación en clase I utilizando una ruta alternativa de presentación de antígeno independientemente de los transportadores de TAP (Wei and Cresswell, 1992).

Finalmente, una de las estrategias más prometedoras para potenciar la presentación antigénica por clase I, consiste en favorecer la entrada de las proteínas en el proteasoma una vez expresadas intracelularmente, por ejemplo tras la vacunación con ADN. Con este objetivo se han utilizado diversas estrategias:

Una de las primeras estrategias empleadas para forzar la degradación de las proteínas en el proteasoma consistió en introducir secuencias desestabilizantes en la proteína de interés para provocar su plegamiento anómalo, su reconocimiento por la maquinaria de degradación dependiente de ubiquitina y su degradación en el proteasoma a pequeños péptidos que demostraban entrar más eficientemente en Clase I (Anton et al., 1999).

Del mismo modo, se han generado versiones vacunales en las que el antígeno de interés se expresa con extremos N-terminales que provocan su inestabilidad intracelular y su reconocimiento por el proteasoma (Varshavsky, 1996), induciendo mejores respuestas TCD8<sup>+</sup> *in vivo* (Tobery and Siliciano, 1999; Tobery and Siliciano, 1997).

Finalmente, la presentación antigénica en clase I puede mejorarse exponencialmente fusionando un residuo de ubiquitina al antígeno de interés, marcando así la proteína para ser degradada en el proteasoma. Esta estrategia ha sido utilizada con éxito en protocolos de vacunación con ADN no sólo contra virus y bacterias, sino también para proteger contra tumores y enfermedades autoinmunes (Barry et al., 2004; Deng and Cai, 2003; Hartl et al., 2003).

En conclusión, favorecer la entrada del antígeno en la ruta de presentación antigénica de clase I mejora la producción de la respuesta celular TCD8<sup>+</sup> entre otros motivos, por suministrar cantidades óptimas de antígeno en la superficie de las CPAs que permitan su contacto con las células T (Badovinac and Harty, 2002; Leifert et al.,

2004; Wherry et al., 1999). La combinación de las estrategias anteriormente descritas podría desembocar en una estrategia óptima de generación de CTLs (Barry and Bleackley, 2002), como ha sido demostrado tras la vacunación contra el papiloma con vacunas ADN expresando minigenes en tándem. En este caso, la fusión a los minigenes de un monómero de ubiquitina y la introducción de espaciadores entre los epítomos que facilitan su procesamiento por las enzimas proteasomales, permitió utilizar la vacuna no sólo como medida preventiva sino también terapéutica para eliminar tumores ya establecidos (Leachman et al., 2002).

1.8.2.2. Potenciación de la respuesta T-CD4<sup>+</sup> (T cooperadora) tras la vacunación optimizando la presentación antigénica por clase II del antígeno vacunal.

Como ya se ha comentado anteriormente, a pesar de que para inducir una respuesta T cooperadora, normalmente el antígeno es captada del medio extracelular, un antígeno intracelular también puede hacerlo, siempre que llegue a los endosomas, donde tiene lugar la carga de péptidos específicos con las moléculas de Clase II (Adorini et al., 1991; Bonifaz et al., 1999; Calin-Laurens et al., 1992; Moreno et al., 1991; Oxenius et al., 1997; Parra-Lopez et al., 1997; Rodriguez and Whitton, 2000).

Así pues, resulta lógico entender que las primeras alternativas para favorecer la presentación antigénica por clase II, se enfocaran en dirigir antígenos a los lisosomas/endosomas utilizando diversas estrategias. Una de las más utilizadas consiste en fusionar al antígeno de interés la señal dependiente de tirosina de la proteína de membrana lisosomal LAMP-I que facilita su transporte a lisosomas/endosomas (Rowell et al., 1995; Thomson et al., 1998a; Wu et al., 1995), resultando muy eficiente incluso en modelos tumorales en ratón (Ji et al., 1999; Lin et al., 1996).

En nuestro laboratorio, hemos descrito una alternativa a este mecanismo consiste en fusionar la señal de unión a lisosomas de la proteína integral de membrana II (LIMP-II) (Vega et al., 1991), al antígeno de interés. Esta estrategia ha resultado muy eficiente a la hora de potenciar la respuesta T CD4<sup>+</sup> tras la vacunación con ADN (Rodriguez et al., 2001).

Finalmente, una tercera estrategia que resulta muy prometedora consiste en fusionar el antígeno de interés a la cadena invariante responsable de mantener vacías a las moléculas de CMH II hasta que se encuentren con su péptido específico (Sanderson et al., 1995). Muchos grupos han descrito la mejora de la presentación antigénica por

clase II mediante la fusión de la cadena invariante a sus epítomos de interés tanto *in vitro* (Fujii et al., 1998; Malcherek et al., 1998) como *in vivo* (De Marco et al., 2003; Nagata et al., 2002; Nagata et al., 2001; van Bergen et al., 2000; van Tienhoven et al., 2001).

#### 1.8.2.3. Potenciación de la respuesta inmunológica dirigiendo los antígenos a las CPAs, sitios de inducción de la respuesta inmunológica: Potenciación de la respuesta humoral y celular

Generalmente, para inducir una respuesta humoral (respuesta B de anticuerpos), las proteínas han de encontrarse en forma soluble para ser endocitadas por mecanismos dependientes de receptor, y así ser presentadas eficientemente. Una de las estrategias que mejor resultados ha deparado a la hora de potenciar la respuesta de anticuerpos consiste no sólo en favorecer que el antígeno se encuentre de forma soluble, sino que además, éste se dirija a las células presentadoras de antígeno (Boyle et al., 1998).

La primera descripción de este efecto vino de la fusión a un antígeno vacunal, de la molécula CTLA4 presente en las células T y cuyos receptores (B7.1 y B7.2) se localizan en las CPAs: CDs y macrófagos principalmente. Tras la vacunación con ADN, las proteínas de fusión se secretaron al medio siendo captadas por las células dendríticas y dando lugar a una mejora exponencial de la respuesta de anticuerpos (Boyle et al., 1998). Esta estrategia ha sido posteriormente utilizada con éxito en multitud de sistemas tanto virales (Deliyannis et al., 2000) como no virales incluso como terapia inmunopreventiva frente al desarrollo de tumores (Tian et al., 2004).

Una de las grandes ventajas de la vacunación con ADN es que permite diseñar protocolos a la carta en los que, en primer lugar permite estudiar en ausencia de ningún otro antígeno interferente, la implicación de cada una de las armas de la respuesta inmunológica en protección frente a un determinado problema y en segundo lugar, que una vez conocidos éstos permitiría inmunizar con un “combinado”, compuesto por ejemplo por un plásmido optimizado para inducir una respuesta CTL junto con otro optimizado para inducir una respuesta CD4 cooperadora, permitiendo así la inducción de una respuesta celular en ausencia de anticuerpos o viceversa (Nagata et al., 2004).

Estos son entre otros los motivos que nos impulsaron en el año 2001, a solicitar el proyecto EET 2001-4217-CO2-02 que ha permitido la realización de esta tesis doctoral.





## 2. OBJETIVOS

*La ciencia existe por la curiosidad del ser humano.*

*Javier Casares.*



El **objetivo general** de este proyecto es el desarrollo de nuevas estrategias vacunales utilizando la inmunización con ADN como herramienta metodológica para la prevención y/o el tratamiento de las enfermedades producidas por priones. Para alcanzar el objetivo propuesto se abordarán los siguientes **objetivos específicos**:

**-Objetivo 1: Estudio comparativo de la respuesta inmunológica inducida por distintas variantes de la molécula del prión.**

En un primer paso pretendemos estudiar la presentación antigénica de la propia molécula del prión de ratón (PrPm) y humano (PrPh), así como de distintas variantes de este último (E200K, D178N y A117V) asociadas a enfermedad y la capacidad de inducir una respuesta inmunológica en el ratón tras la vacunación con ADN.

**-Objetivo 2: Desarrollo de nuevas estrategias inmunoterapéuticas basadas en la mejora de la presentación antigénica.**

A partir de los resultados obtenidos en el objetivo 1 se abordará el desarrollo de varias estrategias inmunoterapéuticas encaminadas a potenciar cada una de las armas de la respuesta inmunológica tras la vacunación en un modelo de ratón.

**- *Potenciación de la respuesta T cooperadora.***

Obtención de vectores ADN en las que se exprese la molécula del prión fusionada a los 19 aminoácidos terminales de LIMPII para mejorar la degradación del antígenos en los lisosomas y potenciar la respuesta T-CD4<sup>+</sup> (cooperadora) inducida.

**- *Potenciación de la respuesta CTL.***

Obtención de vectores ADN en las que se expresen la molécula del prión fusionada al polipéptido celular ubiquitina para mejorar la degradación de los antígenos en el proteasoma y potenciar la respuesta T-CD8<sup>+</sup> citotóxica (CTL).

**-Objetivo 3: Valoración de la capacidad protectora inducida por las diferentes vacunas en un modelo de ratón.**



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

*En principio la investigación necesita más cabezas que medios.*

Severo Ochoa



### **3.1. Líneas celulares empleadas.**

A lo largo del trabajo experimental aquí presentado se han empleado las siguientes líneas celulares: células epiteliales de riñón de conejo (RK13), fibroblastos de riñón de hámster (BHK-21), fibroblastos de riñón de mono verde africano (VERO) y fibroblastos de riñón de cerdo (IBRS-2). Todas las líneas celulares aquí utilizadas fueron adquiridas directamente de la American Type Culture Collection (ATCC).

Las líneas células fueron mantenidas y crecidas a 37° C en atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub>, utilizando en todo momento medio de cultivo DMEM (Cambrex) suplementado con 1% penicilina/estreptomicina (Cambrex), 1% L-glutamina (Cambrex), 10% suero fetal bovino (SFB, Cambrex) y 2% aminoácidos no esenciales (Cambrex). Al tratarse en todos los casos de líneas celulares adherentes, para realizar pases sucesivos éstas fueron lavadas con PBS (Cambrex) y desprendidas del fondo de la botella de crecimiento, utilizando tripsina (Cambrex). Para su conservación a largo plazo, las células fueron congeladas en nitrógeno líquido en un medio constituido por 75% SFB, 10% dimetil sulfóxido (DMSO Sigma), 10% glucosa (Sigma) y 5% DMEM.

### **3.2. Animales y protocolos de inmunización.**

En todos los experimentos, los ratones empleados contaban con 6-8 semanas de edad. Las cepas de ratones singénicos utilizadas, compatibles para su complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), fueron: Ratones 129P2/Ola Hsd (Harlan), ratones 129 PrP null (Manson et al., 1994) y ratones C57BL/6JOlaHsd (Harlan). La cepa de ratones no singénicos Hsd:ICR (CD-1) (Harlan), fue empleada únicamente en los experimentos relacionados con el Virus de la Fiebre Aftosa (VFA).

Igualmente, para realizar los experimentos con VFA en su huésped natural, se emplearon cerdos Landrace x Large White de 6-8 semanas de edad.

Los protocolos de inmunización con ADN en ratón consistieron en tres inmunizaciones con el plásmido correspondiente, espaciadas cada 15 días, repartiendo la vacuna entre los músculos tibiales derecho e izquierdo. Por cada músculo y dosis fueron utilizados 50µl de ADN libre de endotoxinas (Qiagen) resuspendido a una concentración de 1mg/ml en suero salino fisiológico. Este protocolo de inmunización ha resultado ser muy eficiente frente a multitud de patógenos (Rodríguez y col. 1997; 1998; 2000; 2002).



En el caso de la vacunación con ADN en cerdo, el protocolo de inmunización consistió en tres inmunizaciones espaciadas por 15 días repartiendo la vacuna entre el cuadriceps femoral izquierdo, la tabla muscular del cuello y subcutáneamente en oreja. Cada dosis de vacuna consistió en 400µg de ADN libre de endotoxinas resuspendido a una concentración de 1mg/ml en suero salino fisiológico. Este protocolo de inmunización ha resultado eficiente en la vacunación con ADN frente al virus de la Peste Porcina Clásica (Ganges et al., 2005).

### **3.3. Agentes infecciosos utilizados.**

#### **3.3.1. Inóculo de prión infeccioso.**

El inóculo de prión infeccioso empleado procede de un inóculo BSE<sub>1</sub> tras dos pases en ratón C57BL/6JOlaHsd. El inóculo BSE<sub>1</sub> original fue obtenido tras combinar extractos de tronco encefálico procedente de 49 vacas con Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB), confirmados por histopatología (TSE/08/59) y suministrados por la Agencia de Laboratorios Veterinarios Británica (VLA, New Haw, Addlestone, Surrey, UK). Estos troncos encefálicos fueron homogeneizados en PBS y el inóculo obtenido fue pasado dos veces en ratón C57BL/6JOlaHsd.

Los homogeneizados de cerebro (10% peso/volumen) fueron preparados en disolución de PBS conteniendo un 5% de glucosa utilizando un homogenizador Ribolyser (BioRad). Las condiciones empleadas fueron de una primera homogenización durante 30 segundos a una velocidad de 6.5 metros/segundo, un tiempo de reposo de 5 segundos y una segunda homogenización de 25 segundos a la misma velocidad. Previo a su inoculación, los homogeneizados fueron mantenidos durante 10 minutos a 70° C con el fin de minimizar el riesgo de infección bacteriana.

##### **3.3.1.1. Inoculación de los animales con inóculo de prión infeccioso y seguimiento de los signos clínicos característicos de las EETs.**

Los ratones 129P2/Ola o ratones 129 PrP null fueron anestesiados con Avertina (0,015-0,017 ml/g) y posteriormente inoculados en el lóbulo parietal derecho utilizando una aguja hipodérmica de 25G con 20 µl del homogeneizado de cerebro al 10%. El estudio del estado neurológico de los animales inoculados fue realizado mediante la observación de los signos clínicos dos veces por semana. Para considerar que un ratón

tenía una sintomatología típica asociada a una EET, era necesario contabilizar, al menos 3 signos clínicos de disfunción neurológica concomitantemente. Para ello se utilizaron 9 criterios diferentes, siendo anotado cualquiera de los siguientes signos clínicos:

- Andar como un pato: anadear o marcha tambaleante.
- Pelo erizado, áspero o alborotado.
- Cabeza embotada: alerta disminuida, incapacidad para seguir con la cabeza cualquier estímulo externo.
- Alta excitabilidad.
- Incontinencia urinaria.
- Espalda aplanada.
- Descargas oculares pegajosas (legañas).
- Pérdida de peso.
- Jorobado y encorvado.

Cuando la progresión de la enfermedad imposibilitaba la vida sin sufrimiento, los animales eran sacrificados por razones éticas mediante dislocación cervical. A partir de aquellos animales de los que se disponía de muestra fresca, se extrajo el encéfalo completo para analizar por histopatología el grado de degeneración espongiiforme así como por inmunohistoquímica la acumulación de PrP<sup>Sc</sup>. De todas las preparaciones encefálicas se analizó la acumulación de PrP<sup>res</sup> por Western Blot, independientemente de su grado de conservación (muchas de las muestras provenían de animales encontrados muertos a primera hora de la mañana).

### **3.3.2. Virus de la Fiebre Aftosa (VFA)**

La cepa del virus de la fiebre aftosa (VFA) empleada fue C-S8c1. La infección con FMDV *in vivo* fue realizada inyectando cerdos con  $5 \times 10^4$  ufp en rodete coronario.

### **3.3.3. Virus de la Coriomeningitis Linfocitaria del ratón.**

La cepa del virus de la coriomeningitis linfocitaria o LCMV (Lymphocytic Choriomeningitis Virus) empleada fue Armstrong. La infección de ratones con LCMV fue realizada inyectando  $2 \times 10^5$  ufp intraperitonealmente.

#### 3.3.3.1. Análisis de la carga viral en animales infectados con LCMV.

Tras el sacrificio de los ratones, los bazo de los animales fueron extraídos en condiciones de esterilidad y homogeneizados en 1ml de DMEM (Homogenizador Labsonic). Con los extractos obtenidos se realizaron diluciones seriadas en medio DMEM que se utilizaron para infectar 150.000 células Vero crecidas en placas M6 y tras permitir el contacto entre el virus y las células durante 2 horas a 37° C, los inóculos fueron retirados y el medio sustituido por 3 ml de medio DMEM, 5% de suero fetal bovino (SFB), 0,5% agarosa (Invitrogen). Las placas fueron incubadas durante 4 días a 37° C, fijadas con 2ml de formaldehído al 25% durante 10 minutos, y tras eliminarlo junto con el medio sólido, las células fueron teñidas durante 12 horas con 1 ml de cristal violeta al 0,25%. El título de virus fue calculado como el número ufp encontradas por cada gramo de bazo.

#### **3.4. Obtención de plásmidos derivados del pCMV utilizados en protocolos de vacunación con ADN y estudios de expresión *in vitro*.**

A lo largo de la realización de esta tesis fueron generadas una serie de construcciones plasmídicas basadas en los plásmidos pCMV (Clontech) y pET11a (Novagen) en los cuales fueron clonadas las secuencias nucleotídicas que codifican por los antígenos de interés bajo el control del promotor inmediatamente temprano del citomegalovirus humano para su expresión en células eucariotas y del promotor T7 para su expresión procariótica en *E. coli* tras la estimulación con el sustrato adecuado.

Los protocolos de biología molecular utilizados para el clonaje de fragmentos de ADN y obtención de los diversos plásmidos recombinantes derivan de los previamente publicados por Sambrook y col., 1989 (Sambrook et al., 1989), compartiendo en todos los casos una serie de protocolos básicos como son:

- La realización de una reacción en cadena con la Taq polimerasa (PCR) para amplificar las secuencias de ADN de interés utilizando los cebadores (oligonucleótidos específicos) y el molde adecuado según el caso y aplicando las siguientes condiciones estándar para la amplificación de productos: i) un ciclo inicial de desnaturalización del molde de partida (ADN bicatenario) que consiste en su calentamiento a 94° C durante 5 minutos, ii) 30 ciclos de amplificación que comprende cada uno de un periodo de desnaturalización de 94° C durante 20

segundos, seguido de un periodo de 30 segundos que facilita el anillamiento (o hibridación) de los cebadores con el molde y finalmente de un periodo de 1 minuto a 72° C que permite la polimerización de las nuevas cadenas de ADN y iii) un periodo adicional de 10 minutos a 72° C que permite la extensión de los productos de PCR incompletos.

- Los protocolos de ligación con T4 DNA ligasa (Roche), desfosforilación con fosfatasa alcalina (Roche) y cortes de restricción con enzimas de restricción (Roche, NEB), siguiendo siempre las instrucciones indicadas por el proveedor.
- Los plásmidos generados fueron purificados mediante el empleo de resinas de afinidad específicas (Qiagen) siguiendo el protocolo indicado por el proveedor.
- Los plásmidos pCMV fueron transformados en la cepa bacteriana *Escherichia coli* One Shot TOP10F' (Invitrogen) mientras que los plásmidos pET11a fueron transformados en la cepa de *Escherichia coli* BL21 DE3 pLysS (Novagen). En ambos casos, las bacterias fueron transformadas utilizando un protocolo clásico de transformación por choque térmico (Inoue et al., 1990).

#### **3.4.1. Obtención de plásmidos derivados del pCMV conteniendo el gen del prión murino (PrPm).**

La secuencia de ADN codificante para la proteína priónica murina fue obtenida a partir del ADN genómico obtenido a partir de la sangre de ratones 129P2/OlaHsd, tras una digestión con proteinasa K y posterior extracción con cloroformo:alcohol isoamílico (Jeffrey et al., 1994). La secuencia de la PrP murina fue ampliada mediante PCR utilizando cebadores específicos para los extremos 5' y 3' del gen del PrPm que incluían además, la secuencia diana reconocible por la enzima de restricción *BamH* I (Roche), compatibles para su clonaje en el sitio *Bgl* II del pCMV-LII. Con el objetivo de obtener el gen del prión intacto así como una variante del gen sin codón de terminación, se realizaron 2 PCRs independientes utilizando 3 cebadores distintos (Tabla 3): Mientras que el cebador Up murino, que contiene el codón de iniciación del gen PrPm a continuación del sitio *BamH* I, se compartía en ambas reacciones, la inclusión en la reacción de PCR del cebador Stop murino permitía amplificar el gen completo del PrPm, mientras que la inclusión del cebador denominado Non stop murino permitía amplificar una versión del gen del prión sin codón de terminación (Tabla 3)

Secuencia	Nombre del cebador
5'-GGATCCATGGCGAACCTTGGCTGCTGG-3'	Up murino
5'-GGATCCTCATCCCACTATCAGGAAGATG-3'	Stop murino
5'-GGATCCTCCCACTATCAGGAAGATG-3'	Non stop murino

**Tabla 3: Secuencias de los cebadores específicos utilizados para la obtención de los plásmidos conteniendo la PrP murina. En negrita se indica el triplete correspondiente al codón de iniciación del PrPm, así como el triplete complementario al codón de terminación del PrPm. En itálica las secuencias correspondientes al sitio de reconocimiento de *Bam* HI**

Los productos de PCR amplificados fueron purificados utilizando resinas de afinidad específicas (Qiagen) y clonados directamente en el vector pGEM-T Easy (Promega), específicamente diseñado para clonar directamente productos de PCR. Una vez comprobada su secuencia de nucleótidos (obtenida por el método de Maxam y Gilbert (Maxam and Gilbert, 1977) utilizando el servicio de secuenciación de la Universidad Autónoma de Barcelona, los plásmidos pGEM-T Easy recombinantes obtenidos fueron digeridos con *Bam* HI y los fragmentos de ADN correspondientes al inserto de interés, purificados directamente de agarosa utilizando la resina de afinidad correspondiente (Qiagen).

Por otro lado, los plásmidos pCMV-LII (Rodriguez and Whitton, 2000) y pCMV-Ub (Rodriguez and Whitton, 2000) fueron digeridos con la enzima *Bgl* II (Roche).

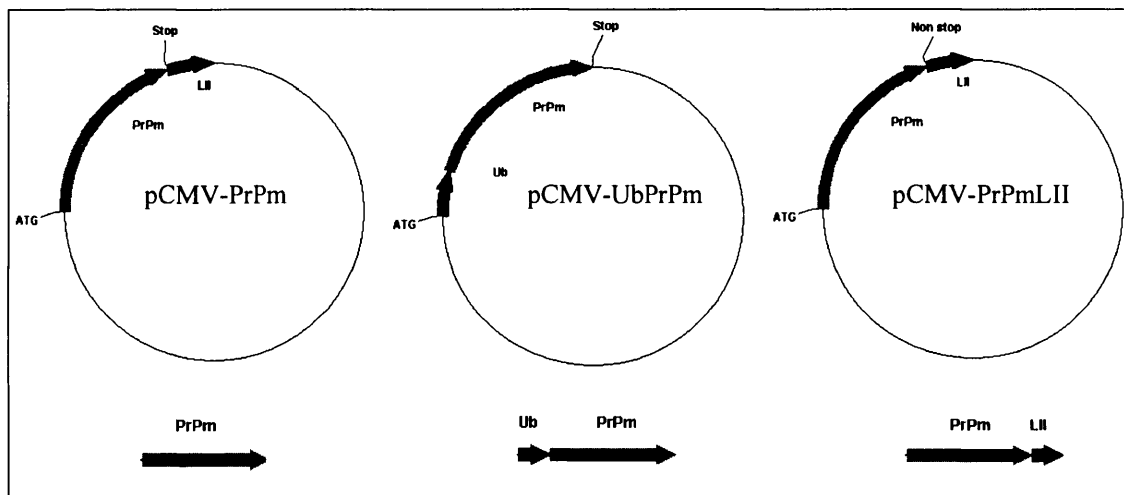
Dada la compatibilidad de los extremos de las secuencias de ambas digestiones, los insertos correspondientes al gen del PrPm obtenidos a partir de la digestión de los plásmidos pGEM-T Easy recombinantes fueron insertados en los plásmidos derivados del pCMV correspondientes, previamente digeridos con *Bgl* II, utilizando la enzima T4 DNA ligasa (Roche). Se realizaron 3 reacciones de ligación independientes:

- 1) El fragmento correspondiente al gen PrPm conteniendo el codón de terminación (stop), se ligó al plásmido pCMV-Ub para obtener el plásmido **pCMV-UbPrPm** que codifica por una versión del príon murino fusionada en fase con un monómero de ubiquitina.

2) El fragmento correspondiente al gen PrPm conteniendo el codón de terminación (stop), se ligó al plásmido pCMV-LII para obtener el plásmido **pCMV-PrPm** que codifica el prión murino por sí sólo, terminando en su codón de terminación.

3) El fragmento correspondiente al gen PrPm sin codón de terminación (non stop), se ligó al plásmido pCMV-LII para obtener el plásmido **pCMV-PrPmLII** que codifica por una versión del prión fusionado a la señal de direccionamiento al lisosoma de LIMP II.

Los plásmidos resultantes, así como los productos a que darían lugar se esquematizan en la figura 8.



**Figura 8:** Representación esquemática de los plásmidos pCMV-PrPm, pCMV-UbPrPm y pCMV-PrPmLII y de los productos proteicos a que darían lugar tras su expresión. Como se puede comprobar en la figura, mientras que la PrPm se fusiona a Ubiquitina utilizando su extremo amino terminal, la fusión a LII tiene lugar a través de su extremo carboxilo terminal. Así, la existencia de un codón de terminación (stop) en el PrPm impide su traducción más allá, mientras que su eliminación e inclusión en fase con la señal de LII permite obtener la molécula de fusión PrPmLII. Se han señalado los codones de iniciación (ATG) y de terminación.

### 3.4.2. Obtención de plásmidos derivados del pCMV conteniendo distintas variantes del gen del prión humano (PrPh).

Las secuencias de ADN codificantes para las proteínas priónicas humanas fueron obtenidas a partir del ADN genómico de sangre de pacientes que presentaban una de las siguientes mutaciones en el gen de la PrP: E200K, D178N o A117V (material cedido por el Dr. Joaquin Castilla, CISA, Madrid). La secuencia codificante de PrP humana sin mutación fue obtenido a partir de sangre de una persona que no presentaba

ninguna de las mutaciones anteriormente descritas. En todos los casos, los individuos disponían de una metionina en la posición 129 de la PrP.

Tanto la obtención del ADN como la PCR se realizó siguiendo los mismos pasos descritos en el apartado anterior, utilizando en este caso cebadores específicos para el gen PrPh y los ADNs aislados del correspondiente paciente como molde (Tabla 4). De nuevo, se incluyó la secuencia de reconocimiento para *BamH* I en cada cebador, conteniendo el cebador correspondiente al extremo 5' del gen, el codón de iniciación ATG y el correspondiente al extremo 3' del gen, el triplete complementario al codón de terminación del gen PrPh.

Secuencia	Nombre cebador
5'-GGATCCATGGCGAACCTTGGCTGCTGG-3'	Up human
5'-GGATCCTCATCCCACTATCAGGAAGATG-3'	Stop human

**Tabla 4:** Secuencias de los cebadores específicos utilizados para la obtención de los plásmidos conteniendo cada una de las variantes, normal y mutada del PrP humano. En **negrita** se indica el triplete correspondiente al codón de iniciación del PrPm, así como el triplete complementario al codón de terminación del PrPm. En *itálica* las secuencias correspondientes al sitio de reconocimiento de *BamH* I

Tras el subclonaje en pGEM-T Easy y posterior escisión con *BamH* I, los distintos fragmentos correspondientes al gen normal del PrPh y de cada una de sus variantes mutadas patogénicas fueron clonados en el plásmido pCMV-LII previamente digerido con *Bgl* II, para acabar obteniendo los plásmidos:

- 1) **pCMV-PrPh**, conteniendo el gen normal del prión humano
- 2) **pCMV-E200K** conteniendo una variante del prión humano que contiene una Lisina (K) en lugar de un Glutámico (E) en posición 200, asociada con el Creutzfeldt-Jakob (CJD) familiar
- 3) **pCMV-D178N** conteniendo una variante del prión humano que contiene una Asparragina (N) en lugar de un Aspártico (D) en posición 178, asociada al Insomnio Familiar Fatal (IFF).

- 4) **pCMV-A117V** conteniendo una variante del prión humano que contiene una Valina (V) en lugar de una Alanina (A) en posición 117, asociada Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS)

### **3.4.3. Obtención de plásmidos derivados del pCMV conteniendo distintas variantes del gen del prión humano fusionadas a una serie de epítomos en tándem (ET).**

Los epítomos seleccionados para ser fusionados en tándem a las distintas isoformas de la PrP humana fueron:

- Sitio A: Epítipo B del virus de la fiebre aftosa (VFA). Se encuentra ubicado en las posiciones 133-156 de la proteína capsídica VP1 (Blanco et al., 2001). Anticuerpos frente a este epítipo son capaces de neutralizar la infección con el virus, por lo que la lectura biológica tras la vacunación resultaba sencilla de realizar.
- NPTh: Epítipo T-CD4<sup>+</sup> (cooperador) del virus de la coriomeningitis linfocitaria del ratón (LCMV). Se encuentra ubicado en las posiciones 308-328 de la nucleoproteína del virus y necesita de la maquinaria lisosomal de la célula presentadora de antígeno (CPA) para ser presentado a las células T (Rodríguez et al., 2001).
- GPTh: Epítipo T-CD4<sup>+</sup> (cooperador) del virus de la coriomeningitis linfocitaria del ratón (LCMV). Se encuentra ubicado en las posiciones 61-80 de la glicoproteína del virus y es presentado a las células T de ratones BL6 (C57) de una manera independiente del lisosoma (Rodríguez et al., 2001).
- MG34: Epítomos T-CD8<sup>+</sup> (CTL) en tándem del virus de la coriomeningitis linfocitaria (LCMV) presentados ambos en la superficie de la célula presentadora de antígeno (CPA) de una manera dependiente del proteasoma. Se trata de la fusión de la secuencia de nucleótidos que codifica por GP<sub>33</sub> (epítipo de la glicoproteína de LCMV posiciones 33-41) presentado por la molécula H2b del CMH I y por NP<sub>118</sub> (epítipo de la nucleoproteína de LCMV posiciones 118-126) presentado por la molécula H2d del CMH I. Mientras que la inducción de una respuesta eficiente frente a GP<sub>33</sub> es capaz de conferir protección frente al LCMV en ratones C57 (BL76), la respuesta CTL frente a NP<sub>118</sub> es protectora para ratones Balb/c cuando es presentado eficientemente (Whitton et al., 1993).

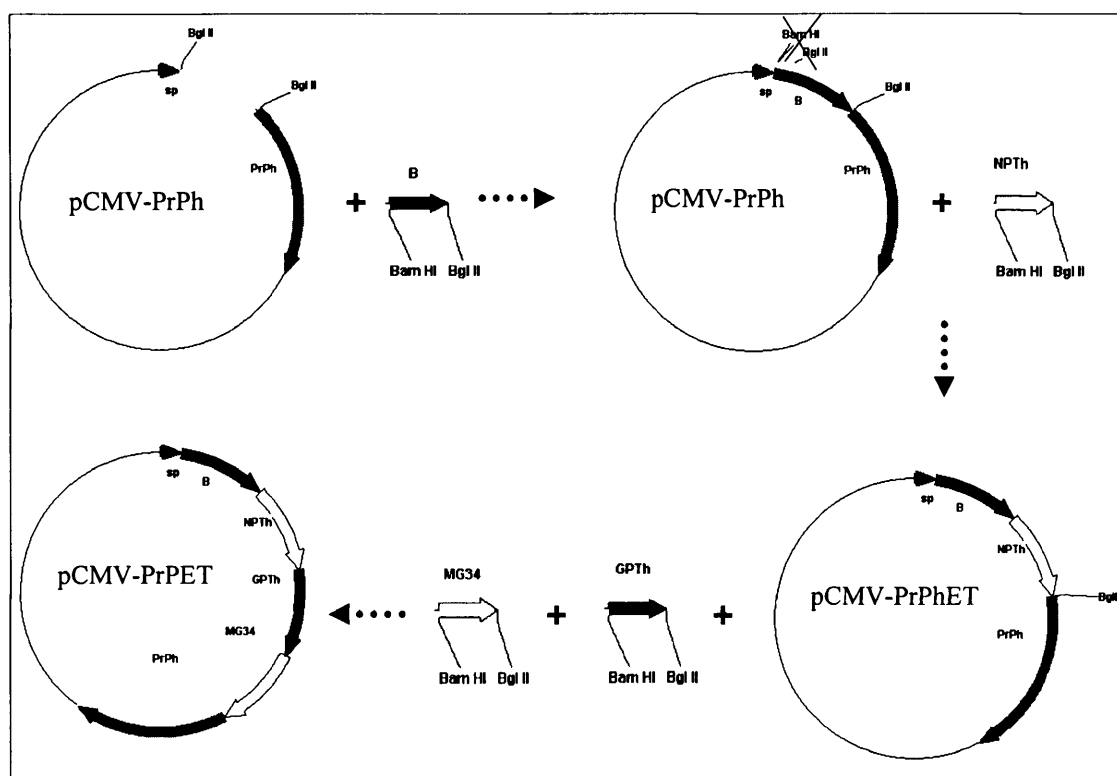


Para obtener los plásmidos conteniendo la molécula del prión humana fusionada a los Epítomos en Tándem (ET), fue necesario partir inicialmente de la construcción pCMV-PrPh generada según lo descrito en el apartado 3.4.2., sobre la cual fue realizada una mutagénesis dirigida por PCR con el fin de insertar una diana única para *Bgl* II en la posición 66 del gen PrPh, utilizando para ello los cebadores especificados en la tabla 5 y así obtener el plásmido intermediario **pCMV-PrPBgII**.

Secuencia	Nombre cebador
5'-GTACGGAAGTGTTACTTCTGC-3'	Up pCMV
5'-GGTACC <i>AGATCT</i> GCAGAGGCCAGGTCACTCC-3'	Down <i>Bgl</i> II
5'-GTGGTTTGTCCAAACTCATC-3'	Down pCMV
5'- <i>AGATCT</i> GGTACCAAGAAGCGCCCGAAGCCTGG-3'	Up <i>Bgl</i> II

**Tabla 5:** Secuencias de los cebadores específicos utilizados para la inserción de una diana *Bgl* II (en *itálica*) en la posición 66 del gen PrPh y obtener el plásmido intermediario pCMV-PrPBgII.

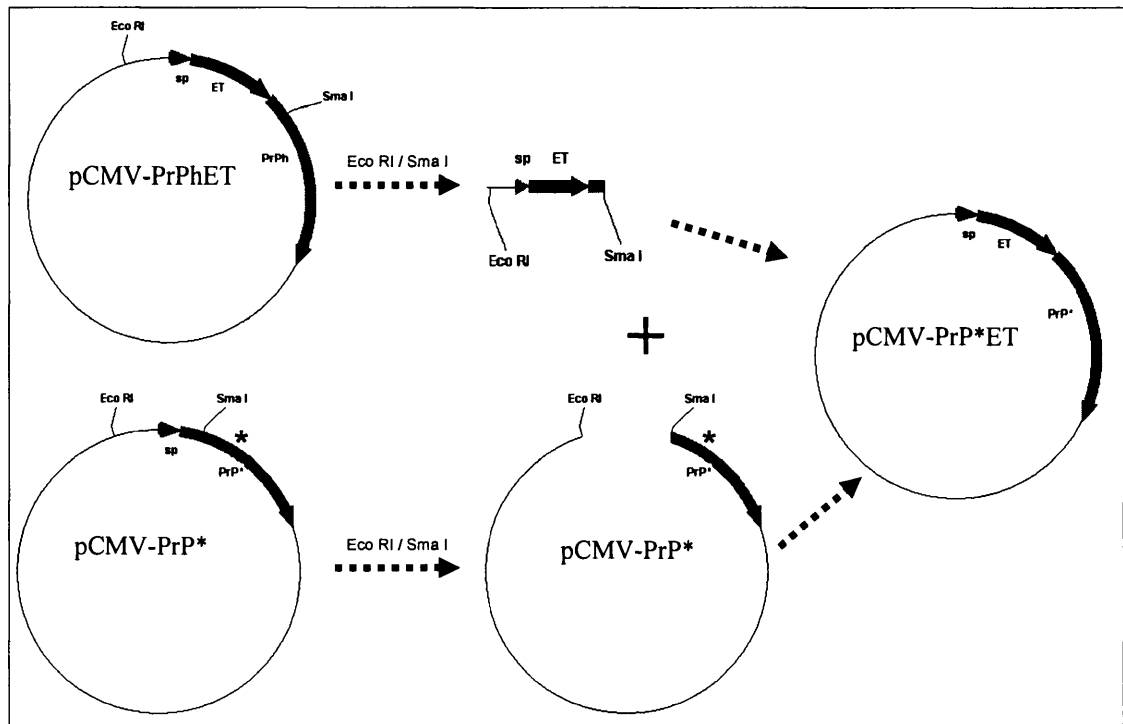
Utilizando esta diana como sitio único de clonaje, se fueron insertando secuencialmente uno a uno los distintos epítomos seleccionados para finalmente obtener el plásmido **pCMV-PrPhET**, siguiendo el esquema mostrado en la figura 9. La disponibilidad en el laboratorio de plásmidos conteniendo las secuencias de nucleótidos correspondientes a cada uno de los epítomos seleccionados (minigenes), flanqueados en su extremo 5' y 3' por los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción *Bam* HI y *Bgl* II, respectivamente, facilitó ostensiblemente la tarea (Rodríguez F, datos no publicados).



**Figura 9.** Representación gráfica de la obtención del plásmido pCMV-PrPhET conteniendo los epítotos en tándem (ET) fusionados al prión humano.

La inserción de secuencias en esta posición exacta permite que los ET queden localizados entre los residuos 22 y 23 de la PrPh, justo tras su péptido señal (sp). La inserción de grandes polipéptidos en este mismo sitio ha demostrado no alterar la conformación ni la actividad fisiológica de la proteína (Telling et al., 1997).

Finalmente, intercambiando el fragmento *Eco* RI - *Sma* I de cada uno de los plásmidos pCMV-E200K, pCMV-D178N y pCMV-A117V, por el mismo fragmento del plásmido pCMV-PrPhET, se obtuvieron los plásmidos pCMV-E200KET, pCMV-D178NET y pCMV-A117VET respectivamente, conteniendo cada una de las variantes patogénicas del prión fusionadas a los ET (Figura 10).



**Figura 10.** Representación gráfica de la obtención de los plásmidos conteniendo las distintas variantes mutantes del gen del prión humano (PrP\*) fusionados a los ET. (\*) Representa las mutaciones en el gen de la PrPh en estudio.

Dada la necesidad de disponer de controles negativos experimentales, se generaron dos nuevos plásmidos cuya expresión daba lugar por un lado, al péptido señal de la proteína del prión humano fusionado a los ET (pCMV-spET) y por el otro a los ET por sí solos (pCMV-ET).

Previo a la obtención de ambos, fue necesario amplificar la fase de lectura abierta que codifica los ET incluyendo un codón de terminación detrás del MG34. La PCR se realizó utilizando como molde de la reacción, el plásmido pCMV-PrPhET y como cebadores dos oligonucleótidos que hibridan con el 5' y con el 3' de la secuencia correspondiente a los ET y que contienen la secuencia diana de *Bam* HI seguida de un ATG de iniciación y la secuencia diana *Bgl* II seguida del triplete complementario a un codón de terminación, respectivamente (Tabla 6).

Secuencia	Nombre cebador
5'- <b>GGATCC</b> ATGACTACGACGTACACCGCCAGTGCACGC-3'	Up B
5'- <b>AGATCT</b> ATGTTAAGTTCCCCATATATA-3'	Down stop MG34

**Tabla 6: Secuencias de los cebadores específicos utilizados para la obtención de la secuencia correspondiente a los ET. En negrita se indica el triplete correspondiente al codón de iniciación del PrPm, así como el triplete complementario al codón de terminación de los ET. En itálica las secuencias correspondientes al sitio de reconocimiento de *Bam* HI y *Bgl* II.**

Tras el subclonaje del fragmento de PCR en pGEM-T Easy, el plásmido fue digerido con las enzimas de restricción *Bam* HI y *Bgl* II, purificado y clonado:

- En el vector pCMV-LII para obtener el plásmido **pCMV-ET**, que expresará los ET por sí solos.
- En el vector pCMV-PrPh*Bgl*II para obtener el plásmido **pCMV-spET** que expresará los ET fusionados al péptido señal del prión humano.

#### **3.4.4. Obtención de plásmidos derivados del pCMV conteniendo los epítopos BTT del virus de la fiebre aftosa.**

Para la obtención de los plásmidos pCMV-BTT y pCMV-spBTT fue necesario realizar una reacción de PCR capaz de amplificar la secuencia de BTT con codón de terminación, utilizando como molde el plásmido pGEM-T Easy-BTT previamente disponible en el laboratorio (Borrego y Rodríguez, datos sin publicar) y que contiene las secuencias codificantes para estos tres epítopos en tándem en el plásmido pGEM-T Easy (Promega). Como cebadores de la reacción se diseñó un oligonucleótido específico para el extremo 5' de BTT que contienen la secuencia diana de *Bam* HI seguida de un ATG de iniciación y un oligonucleótido que hibrida con el extremo 3' de la secuencia correspondiente a BTT y que contienen la secuencia diana *Bgl* II seguida del triplete complementario a un codón de terminación (stop) (Tabla 7).

Secuencia	Nombre cebador
5'-GGATCC <b>ATG</b> ACTACGACGTACACCGCCAGTGCACGC-3'	Up B
5'-AGATCT <b>CTA</b> CATGGAGTTTGGTACTGC-3'	Down BTT stop

**Tabla 7: Secuencias de los cebadores específicos utilizados para la obtención de las secuencias correspondientes a BTT con el codón de terminación incluido. En negrita se indica el triplete correspondiente al codón de iniciación de BTT, así como el triplete complementario al codón de terminación de BTT. En itálica las secuencias correspondientes al sitio de reconocimiento de *Bam* HI y *Bgl* II**

Tras el subclonaje del fragmento de PCR en pGEM-T Easy, el plásmido fue digerido con las enzimas de restricción *Bam* HI y *Bgl* II.

El inserto correspondiente a BTT conteniendo el codón de terminación se clonó:

- 1) En el vector pCMV-LII para obtener el plásmido **pCMV-BTT**, que expresará los BTT por sí solos.
- 2) En el vector pCMV-PrPhBglIII para obtener el plásmido **pCMV-spBTT**, que expresará BTT fusionado al péptido señal del PrPh.

### **3.4.5. Expresión *in vitro* de las distintas variantes del prión a partir de los plásmidos derivados de pCMV.**

Previo a los experimentos de vacunación con ADN, se estudió la expresión transitoria de cada uno de los plásmidos derivados del pCMV, tras su transfección en las líneas celulares establecidas de mamífero: BHK-21, RK13 y/o IBRS-2.

De manera resumida, las líneas celulares se crecieron hasta alcanzar un 70-80% de confluencia en placas M6 (9 cm<sup>2</sup> de superficie), momento en el que fueron transfectadas empleando Lipofectamine y Plus reagent (liposomas de Invitrogen), siguiendo el protocolo indicado por la casa comercial. Para cada transfección se utilizaron 2 µg de plásmido y durante ésta, las células se mantuvieron en el medio de cultivo OPTIMEM (Invitrogen), en ausencia de suero fetal bovino (inhibidor de la transfección con liposomas). 48 horas tras la transfección las células fueron lavadas, tripsinizadas y pasadas a placas Lab-Tek (Nunc) para realizar los estudios de expresión mediante inmunofluorescencia o inmunoperoxidasa utilizando anticuerpos específicos para el producto clonado.

Las inmunofluorescencias indirectas (Botija, 1970) se realizaron sobre la monocapa de células transfectadas y previamente sembradas en cámara Lab-Tek. Las células fueron fijadas con metanol (Merck) durante 10 minutos en frío, lavadas 3 veces con PBS y los sitios de unión de proteínas inespecíficos, se bloquearon durante 30 minutos a 37° C, utilizando suero de caballo diluido al 1:100 en PBS. Posteriormente, se realizó la incubación con el anticuerpo primario correspondiente: para el prión se utilizó bien el monoclonal 2A11 (Brun et al., 2004) a una dilución del 1:100, el monoclonal 3F4 (DakoCytomation) a una dilución del 1:300 o el policlonal de conejo R007 (Suministrado cortésmente por el Dr. Alejandro Brun, CISA, Madrid) a una dilución de 1:300. Todos los anticuerpos primarios fueron diluidos en PBS y 1% de suero de caballo e incubados durante una hora a 37° C en cámara húmeda. Tras realizar tres lavados con PBS, las células se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente durante 1 hora a 37° C. Dependiendo del anticuerpo primario utilizado y del experimento a realizar, se utilizaron los siguientes anticuerpos secundarios diluidos al 1:300 en PBS 1% de suero de caballo: anti-IgG de ratón conjugado a ficoeritrina (PE), anti-Ig (G+M+A) de ratón conjugado a fluoresceína (FITC), anti-IgG de conejo conjugado a fluoresceína (FITC) y anti-IgG de conejo conjugado a Texas red (TR). Mientras que éste último anticuerpo es comercializado por Axxora Platform, los tres primeros anticuerpos conjugados pertenecen a la casa comercial Sigma. Tras tres lavados finales con PBS, los portaobjetos de las cámaras Lab-Tek fueron montados con Fluoprep (BioMérieux), para optimizar su visualización en el microscopio de fluorescencia.

En aquellos casos en que fue requerido, las células fueron incubadas durante 8 horas, bien con el inhibidor del proteasoma MG132 (Calbiochem) a una concentración de 20  $\mu$ M, o bien con 20 mM de cloruro amónico, inhibidor de lisosomas, para a continuación realizar la inmunofluorescencia.

### 3.5. Obtención de plásmidos derivados del pET 11a y expresión de las proteínas maduras del prión en *Escherichia coli*.

#### 3.5.1. Obtención de plásmidos derivados del pET 11a conteniendo distintas variantes del gen del prión para su expresión en *E. coli*.

Las secuencias de ADN codificantes para las distintas variantes maduras de proteína del prión humana (correspondiente a los aminoácidos 29–225 de la PrP: sin péptido señal ni fragmento carboxilo transmembrana), fueron generadas mediante PCR utilizando como molde los plásmidos pCMV-PrPh, pCMV-E200K, pCMV-D178N y pCMV-A117V. Así mismo, la secuencia de ADN codificante para la proteína del prión murina madura fue obtenida también mediante PCR. Los cebadores que hibridan con el extremo 5' contienen la secuencia diana para la enzima de restricción *Nde* I conteniendo el ATG de iniciación y los cebadores que hibridan con el extremo 3' del gen contienen la diana de restricción *Bam* HI, así como el triplete complementario de un codón de terminación (Tabla 8).

Secuencia	Nombre cebador
5'- <i>CATATGA</i> AGAAGCGCCCGAAGCCTGG-3'	Up human mature
5'-GGATCCTTACGATCCTCTCTGG-3'	Down human mature
5'- <i>CATATG</i> AAAAAGCGGCCAAAGCCTGG-3'	Up mouse mature
5'-GGATCCTTAGGATCTTCTCCCGTC-3'	Down mouse mature

**Tabla 8:** Secuencias de los cebadores específicos utilizados para la obtención de las secuencias codificantes de las proteínas del prión humanas y murina maduras. En negrita se indica el triplete correspondiente al codón de iniciación, así como el triplete complementario al codón de terminación. En itálica las secuencias correspondientes al sitio de reconocimiento de *Nde* I y *Bgl* II.

Los fragmentos obtenidos tras la PCR fueron purificados y clonados en el plásmido pGEM-T Easy a partir del cual fueron digeridos utilizando la enzimas de restricción *Nde* I y *Bam* HI. Una vez purificado cada inserto fue clonado directamente en el un plásmido derivado del pET 11a (Novagen) (que permitirá la expresión de la

forma madura de la proteína clonada), digerido con estas mismas enzimas para obtener los plásmidos: **pET-PrPh**, **pET -E200K**, **pET -D178N**, **pET-A117V** y **pET-PrPm**.

Finalmente y como control negativo experimental, fue clonada la secuencia de los epítomos BTT del virus de la fiebre aftosa en el plásmido pET 11a. La existencia de las secuencias diana para *Nde* I y *Bam* HI en el sitio de clonaje del plásmido pGEM-T Easy-BTT (véase apartado 3.4.4.) permitió la escisión de la secuencia BTT, su purificación y su posterior clonaje en el plásmido pET 11a.

### **3.5.2. Inducción de la expresión de las proteínas maduras del prión en *E. coli*.**

Los plásmidos pET 11a conteniendo las secuencias que codifican para cada una de las variantes (sin y con mutaciones) maduras de la proteína del prión humana y murina fueron transformados en las bacterias competentes *Escherichia coli*, cepa BL21 DE3 pLysS (Novagen) utilizando un protocolo clásico de choque térmico (Inoue et al., 1990). Previo a la inducción de la expresión de la proteína, cada colonia se inoculó en un litro de medio Luria Bertoni (LB) con ampicilina (50µg/ml, Roche), permitiendo su crecimiento hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica (D.O.<sub>600</sub>) de 0,5, momento en que se añadió IPTG (Roche) a 1mM durante 2 horas para permitir la inducción de la síntesis específica de las proteínas.

Finalmente, las células fueron centrifugadas y lavadas 2 veces con tampón de lavado (0,5M cloruro amónico y 20mM fosfato sódico, pH 7,8). En el último lavado se añadió 0,5mg/ml lisozima (Sigma) y el inhibidor de proteasas PMSF (Sigma) al 1mM. Tras dos ciclos de sonicación (Sonicador Labsonic M, B. Brown, 100% amplitud, 1 único ciclo de 5 minutos), las células fueron centrifugadas a 5000 rpm (centrífuga Sorvall, rotor SS34) durante 15 minutos a 4° C y resuspendidas en tampón de desnaturalización (8M urea, 0,5M cloruro sódico, 20mM fosfato sódico, pH 7,8). El lisado fue sonificado (100% amplitud, 1 único ciclo de 5 minutos) y centrifugado a 4000 rpm (centrífuga Sorvall, rotor SS34) durante 10 minutos a 4° C y finalmente resuspendido en 4ml de tampón de desnaturalización, conservándose a -80° C hasta su utilización.

Para semipurificar la proteína madura del prión, los extractos anteriores fueron dializados frente a PBS (Celulosa de diálisis, Sigma, MW 12.400) y semipurificados mediante cromatografía de intercambio iónico utilizando Sepharosa (Amersham



Biosciences). Tras permitir su unión a la matriz de afinidad y los posteriores lavados, las proteínas del prión fueron eluidas utilizando concentraciones crecientes de cloruro sódico. El rango de concentración en el cual fue eluida la proteína murina del prión fue de 0,5-1M.

La concentración específica de proteína obtenida fue estimada mediante tinción de geles SDS-PAGE con Coomassie, utilizando como patrón de concentración conocida, la seroalbúmina bovina (BSA, Sigma). Así, las muestras fueron preparadas con tampón de carga SDS (Invitrogen) y cargadas en geles Novex-Tris-glicina (12%) (Invitrogen), realizando electroforesis a 200 voltios durante una hora en tampón de corrida (Novex). Para la tinción con Coomassie, el gel fue sumergido en una disolución: 12,5 % Coomassie (1%, Coomassie Blue, Sigma), 50% metanol y 10% ácido acético. Cuando las proteínas fueron visibles, el gel fue lavado con agua destilada y secado con el sistema "Novex gel drying kit" (Invitrogen).

Para confirmar la especificidad de las proteínas, se utilizó la técnica de Western-Blot utilizando anticuerpos específicos. En este caso, los geles fueron transferidos a una membrana de PVDF-Inmobilon-P (Millipore) durante 2 horas a 47 voltios en tampón de transferencia (0,3% Tris base, 1,4% glicina en agua destilada), empleando los equipos de transferencia de Invitrogen. Tras el bloqueo de las membranas con PBS 5% leche descremada la detección específica de la PrP humana fue realizada con el anticuerpo monoclonal 3F4 (DakoCytomation) a una concentración de 1:1000 en PBS 5% leche descremada 0,05% Tween (Sigma). En el caso de la PrP murina la detección fue realizada utilizando el anticuerpo monoclonal 2A11 (Brun et al., 2004) a una dilución 1:3000. Los inmunocomplejos fueron detectados con un anticuerpo secundario frente a Ig G, Ig A e Ig M de ratón conjugado a peroxidasa (Sigma) y el revelado se realizó utilizando el sustrato quimioluminiscente ECL (Amersham), siguiendo las instrucciones del proveedor.

### **3.6. Caracterización de la respuesta inmunológica tras la vacunación con ADN.**

#### **3.6.1. Medición de la respuesta humoral o de anticuerpos.**

##### **3.6.1.1. ELISA para detectar anticuerpos específicos frente al prión.**

Los pocillos de placas de ELISA fueron tapizados con 300 ng de proteína semipurificada recombinante PrP expresada en *E. coli* (ver apartado 3.5.2 de esta sección) previo bloqueo con PBS-5% leche descremada durante 12 horas a 37° C. La incubación con los sueros de los ratones (anticuerpos primarios) se realizó a 37° C durante una hora y las diluciones de los sueros fueron preparadas en PBS 5% leche descremada conteniendo 0,1% Tween 20. A continuación, las placas fueron lavadas 3 veces con PBS-0,1% Tween 20 e incubadas durante 1 hora a 37° C con el anticuerpo secundario anti-Ig (G+A+M) de ratón conjugado a peroxidasa (Sigma), diluido al 1:1000 en PBS-5% leche descremada-0,1% Tween 20. Tras realizar otros tres lavados con PBS-0,1% Tween 20, se reveló la reacción añadiendo 100µl del sustrato ABTS (Calbiochem) por cada pocillo. La reacción se paró añadiendo 100 µl de SDS al 1% y la lectura del resultado se realizó a una longitud de onda de 405 nm.

##### **3.6.1.2. Western Blot para detectar anticuerpos específicos frente al prión.**

Para la detección de anticuerpos específicos frente al prión a partir del suero de los ratones se utilizaron los siguientes antígenos: 300ng de proteína semipurificada recombinante de *E. coli* (la misma utilizada en el ELISA), 10µl de un extracto soluble de cerebro de un ratón sano no infectados (PrP<sup>C</sup>) o 10µl de un extracto soluble de cerebro de un ratones infectado con el inóculo infeccioso tras el tratamiento con Proteinasa K (PrP<sup>res</sup>). Los sueros procedentes de los ratones deficientes para PrP (PrPKO) fueron ensayados a una dilución de 1:3200 y los de los ratones normales fueron utilizados al 1:200. Las condiciones de extracción a partir del encéfalo de ratón y del ensayo del Western Blot fue el descrito en el apartado 3.5.2. de esta sección.

### 3.6.1.3. Métodos para detectar anticuerpos frente al VFA.

#### 3.6.1.3.1. ELISA específico frente al VFA.

El ELISA utilizado para la detección de anticuerpos frente al VFA fue de tipo “sándwich”. Los pocillos de placas de ELISA fueron tapizados con 50 µl de un suero policlonal de conejo anti-C1-Noville (Pirbright IAH 2005) a una dilución 1/3000 en tampón carbonato-bicarbonato. Tras la incubación toda la noche a temperatura ambiente, se realizaron tres lavados con PBS-0,05% Tween 20. Para tapizar las placas se utilizaron dos antígenos diferentes: a) 50 µl por pocillo de sobrenadante de células IBRS-2 infectadas con VFA cepa CS8 a una dilución 1:2 b) 125ng por pocillo del péptido sintético A24. En ambos casos, la dilución fue realizada en PBS 0,05% Tween 20, 2% leche descremada y la incubación realizada durante 1 hora a 37° C. Los sueros de los animales fueron utilizados a una dilución 1/35 en PBS, 0,05% Tween 20 y 2% leche descremada. El anticuerpo secundario utilizado fue un anti-IgG conjugado a peroxidasa (BioRad) a una dilución 1/2000 en PBS, 0,05% Tween 20, 2% leche descremada y 10% suero fetal bovino. La incubación fue realizada durante 1 hora a 37° C y el revelado se realizó añadiendo como sustrato de la reacción, 50 µl de OPD (Sigma). Tras 10 minutos de incubación a temperatura ambiente, la reacción fue parada con 50 µl de ácido sulfúrico y la lectura realizada a 492nm.

#### 3.6.1.3.2. Seroneutralización de VFA.

Para realizar los ensayos de neutralización, 60 unidades formadoras de placa (ufp) del VFA se pusieron a incubar con diluciones seriadas de cada suero durante 1 hora a 4° C para a continuación realizar la infección sobre monocapas confluentes de células IBRS-2 creciendo en placas de M6. Tras permitir la adsorción del virus durante 1 hora a 37° C con atmósfera de CO<sub>2</sub>, el medio fue retirado y sustituido por 2 ml de una disolución 49,5% agar noble (Invitrogen), 49,5% EMEM 2x (Gibco) y 1% SFB. Cuando el agar se hubo secado, las placas fueron incubadas a 37° C durante 24 horas y posteriormente fijadas con 2 ml de formaldehído al 2% durante 10 minutos. El agar fue retirado y la monocapa teñida con una disolución cristal violeta (0,3% cristal violeta, 5% formaldehído, 10% etanol 96° y 85% agua destilada) durante 24 horas. El título de la seroneutralización fue estimado como el valor recíproco de aquella dilución del suero en la cual se observó un 50% de reducción de placas de lisis.

### **3.6.2. Medición de la respuesta celular mediante un ensayo de tinción intracelular de interferón gamma (IFN $\gamma$ ).**

Tras el sacrificio de los ratones, los bazo de los animales fueron extraídos en condiciones de esterilidad, para a continuación ser macerados en medio de cultivo RPMI, filtrados a través de filtros Sigma CD-1 60 (medida del “poro” de la red del “colador”). Tras una primera centrifugación, se lisaron los eritrocitos resuspendiendo las células en 2ml de cloruro amónico 0,155M pH 7,3. A continuación se realizaron una serie de lavados con medio RPMI completo tras los cuales los esplenocitos obtenidos fueron contados y sembradas a una densidad de  $10^6$  células por pocillo de placa M96 (Nunc) en medio RPMI completo.

Los esplenocitos purificados fueron incubados durante un periodo de tiempo que variaba entre las 6 y las 36 horas dependiendo del experimento, en medio completo RPMI y en presencia del estímulo correspondiente:

i) En el caso de la estimulación específica con proteína del prión recombinante, ésta se utilizaba a una concentración de  $1\mu\text{g/ml}$  durante 36 horas.

ii) En el caso de la estimulación específica con péptidos del LCMV éstos se utilizaban a una concentración de  $1\mu\text{g/ml}$ , durante 6 horas.

Mientras que en el último caso las células se cultivaban en continua presencia de Brefeldina A (BFA, Sigma) a  $5\mu\text{g/ml}$ , para el caso de proteína de prión recombinante, tres horas antes de finalizar la incubación, se añadía BFA a una concentración de  $10\mu\text{g/ml}$  para evitar de este modo la secreción proteica y permitir la acumulación de la citoquina intracelularmente.

Una vez finalizada la estimulación, se procedía al marcaje de superficie utilizando la mezcla de anticuerpos anti-CD8-Cycron y anti-CD4-Ficoeritrina (Pharmingen), diluidos al 1:200 en PBS-5% suero fetal bovino, durante 30 minutos en frío. A continuación y tras realizar tres lavados con PBS-5% SFB, se procedió a la permeabilización de las células utilizando formaldehído (Sigma) al 2% en PBS durante 20 minutos en frío. Tras lavar de nuevo las células 3 veces, en esta ocasión con Perm Wash (Pharmingen), se realizó la tinción intracelular utilizando el anticuerpo anti-IFN $\gamma$ -FITC (Pharmingen) a una dilución 1:100 en Perm Wash. Finalmente, las células fueron lavadas con Perm Wash y resuspendidas en formalina (Sigma) diluida al 2% en PBS. Todos los datos representados se obtuvieron a partir de las células vivas seleccionadas a

partir de 1 millón de células totales analizadas en un Citómetro de Flujo, modelo Excalibur (BD).

### **3.6.3. Medición de la respuesta celular mediante un ensayo de linfoproliferación.**

Los experimentos relacionados con el VFA en porcino fueron realizados ensayos de linfoproliferación utilizando linfocitos purificados a partir de la sangre de los animales vacunados justo antes de la infección con el virus, utilizando VFA como estímulo *in vitro*. Para ello, la sangre de los cerdos en estudio fue recogida en presencia de anticoagulantes (5mM EDTA) y los linfocitos fueron purificados utilizando un gradiente de Ficoll (Pharmacia).  $2,5 \times 10^5$  células fueron sembradas en cada pocillo en presencia de RPMI y fueron estimuladas con  $10^5$  ufp del VFA durante 4 días a 37° C. Como control negativo, las células fueron estimuladas con medio RPMI solo. Tras 4 días de estimulación fue realizado un pulso de 18 horas con  $0.5 \mu\text{Ci}$  of [methyl-3H] timidina para finalmente realizar la medición de cuentas por minuto (cpm) en un contador de centelleo (Pharmacia). La proliferación se realizó tanto en ausencia como en presencia de concentraciones saturantes de anticuerpos anti-clase I (MAb 74-11-10) (Pescovitz et al., 1985) o anti clase II (MAb MSA-3) (Hammerberg and Schurig, 1986).

## **3.7. Análisis comparativo de la acumulación de PrP<sup>res</sup> en el encéfalo de los ratones vacunados con ADN.**

### **3.7.1. Histopatología e inmunohistoquímica.**

Aquellos animales infectados con el inóculo del prión infeccioso y sacrificados por motivos éticos y humanitarios (ver apartado 3.3.1.1.) fueron sujetos a necropsia y sus encéfalos fijados por inmersión en una disolución al 10% de formol durante una semana. Las muestras fueron cortadas transversalmente y fueron sumergidas en ácido fórmico al 98% durante una hora para inactivar la PrP<sup>res</sup> antes de seguir con el proceso de rutina de inclusión en parafina. Secciones de 5 micras de grosor fueron cortadas y teñidas con hematoxilina-eosina (HE) (Sigma) o con Cresy Echt violeta (Tinción de Nissl) (Sigma) para los análisis histopatológicos habituales.

Para realizar la inmunohistoquímica, las secciones fueron hidratadas y la peroxidasa endógena fue eliminada incubando la muestra con una disolución al 3% de

peróxido de hidrógeno en metanol durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las muestras fueron tratadas con ácido fórmico al 98% durante 5 minutos a temperatura ambiente y autoclavadas a 126° C durante 11 minutos para desenmascarar los diferentes epítomos. Previo a la incubación con anticuerpos, se realizó una digestión con proteinasa K (Roche) (4µg/ml en Tris-HCL pH 7,8) durante una hora a 37° C. Las secciones de los tejidos fueron bloqueadas durante 30 minutos a temperatura ambiente con una disolución al 10% en PBS de suero de cabra (Sigma). Las muestras fueron incubadas a 4° C durante toda la noche con los anticuerpos primarios monoclonales 6H4 (Prionics) y 2A11 (Brun et al., 2004) diluidos a 1:400 y 1:3000 en PBS respectivamente. Tras esta incubación y posterior lavado, las muestras fueron incubadas con el anticuerpo secundario anti IgG de ratón conjugado a peroxidasa (Dako) diluido a 1:20 en PBS. El sustrato empleado para el revelado de las muestras fue 3,3'-diaminobencidina (Sigma).

### 3.7.2. Western blot

Los encéfalos de los ratones infectados con el inóculo infeccioso del prión fueron homogeneizados en la disolución de extracción (0,5% Nonidet-40, 1% deoxicolato sódico, 10mM EDTA en PBS pH 7,4). 100 µl de las muestras fueron centrifugados a 2.000 g durante 5 minutos para clarificar el extracto. La presencia de PrP<sup>res</sup> en los cerebros de los animales infectados fue determinada a partir de la fracción insoluble obtenida tras la centrifugación de estos extractos a 25.000 g durante 30 minutos en colchón de sacarosa al 15%. Una vez resuspendidos los sedimentos en PBS y 5% de sarcosil, las muestras fueron (o no) digeridas con 2 µg/ml de proteinasa K y finalmente, fueron tratadas con tampón de carga SDS (Invitrogen) para ser cargadas en geles Novex-Tris-glicina (12%) (Invitrogen). Las condiciones de electroforesis, transferencia y Western Blot fueron las mismas a las descritas en el apartado 3.5.2.

Para los estudios de deglicosilación de las proteínas, tras el tratamiento con proteinasa K los precipitados fueron lavados con 20mM de fosfato sódico pH 7,8 y resuspendidos en tampón de deglicosilación (1% SDS, 0,5% NP40, DTT). Las muestras fueron desnaturalizadas a 100° C durante 10 minutos y tratadas con 250 unidades de PNGasaF (NEB) en tampón de fosfato sódico pH 7,8. Tras la incubación durante toda la noche, se añadieron 4 volúmenes de metanol frío y fueron mantenidas durante 2 horas a -80° C. Las proteínas fueron precipitadas centrifugando las muestras durante 30 minutos a 25000 g y resuspendidas en tampón de carga SDS (Invitrogen). A continuación fueron

cargadas en un gel Novex-Tris-glicina (12%) Las condiciones de electroforesis y la inmunodetección fueron las mismas a las descritas anteriormente.

#### 4. RESULTADOS

*La ciencia empieza cuando alguien  
descubre lo mas mínimo sobre ella.*

Javier Casares





Una de las características más peculiares de las enfermedades causadas por priones, ampliamente descrita a lo largo de la introducción, es la ausencia de una respuesta inmunológica frente al agente causal de las mismas, al menos detectable con los métodos diagnósticos clásicos. El hecho de que el prión sea un antígeno propio junto con la evidencia demostrada de que el propio sistema inmunológico actúa como caballo de Troya facilitando la diseminación del prión infeccioso, contribuye a explicar este fenómeno.

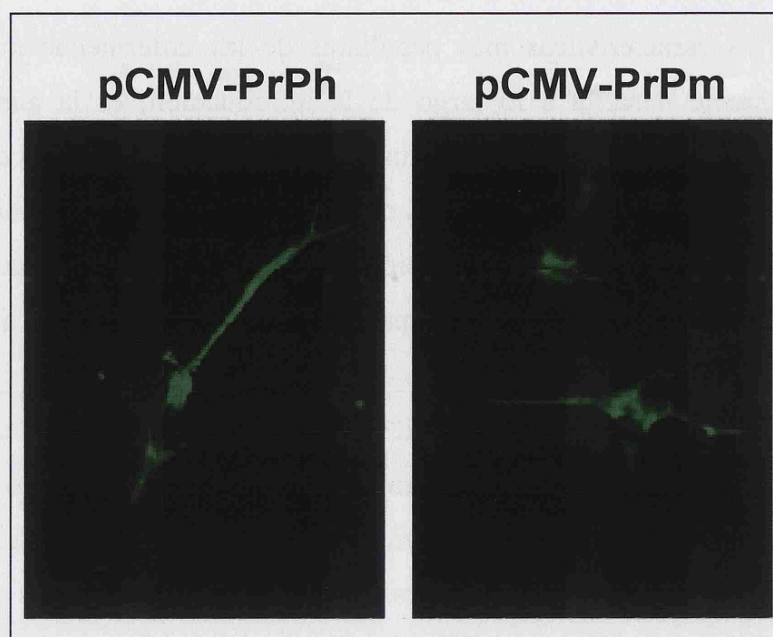
A pesar de las dificultades y riesgos que supone el plantear estrategias inmunoterapéuticas y/o preventivas contra un antígeno propio como es el prión, decidimos abordar esta tarea utilizando como herramienta metodológica la vacunación con ácidos nucleicos, combinando diversas estrategias encaminadas a mejorar la presentación antigénica de la vacuna. El hecho de que algunas de estas estrategias hayan resultado eficaces en nuestro laboratorio, incluso para romper la tolerancia frente a un antígeno tumoral propio (Xiang et al., 2000), permitía ser optimista en cuanto a la consecución de nuestros objetivos.

#### **4.1. Vacunas ADN contra el prión y el concepto de tolerancia.**

El concepto de “tolerancia inmunológica” permite explicar la ausencia de respuesta inmunológica frente a un antígeno propio, incluso tras la vacunación frente al mismo (Cohen, 2005; Medawar, 1953).

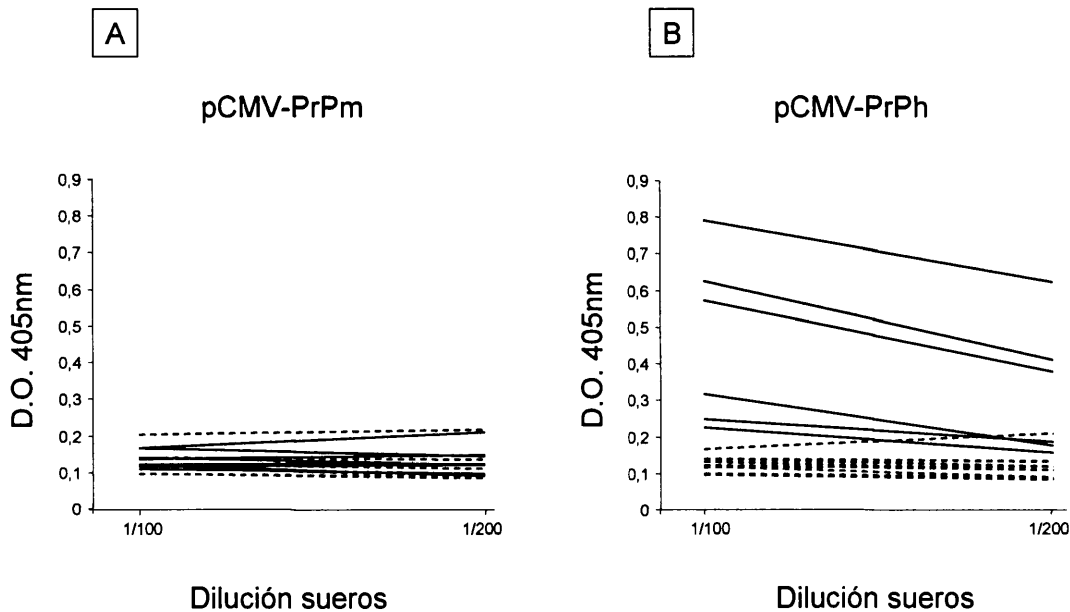
Con el primer experimento que a continuación se describe, se pretendía comprobar si el fenómeno de tolerancia frente al prión se mantenía también tras la vacunación con ADN.

En primer lugar, se generaron los plásmidos pCMV-PrPm y pCMV-PrPh, que contienen el gen completo del prión murino y humano respectivamente, bajo el control de un promotor eucariótico (ver en materiales y métodos). A continuación, ambos plásmidos fueron transfectados en células BHK para comprobar su expresión mediante inmunofluorescencia utilizando anticuerpos específicos contra cada una de las especies de prión (Figura 11). Como era de esperar, las células transfectadas mostraron una clara localización en membrana celular.



**Figura 11:** Transfección de células BHK con los plásmidos pCMV-PrPh (izquierda) y pCMV-PrPm (derecha). La inmunofluorescencia fue realizada empleando el anticuerpo monoclonal 3F4 (DakoCytomation) en el caso de la transfección con pCMV-PrPh (figura izquierda) y 2A11 (Brun et al., 2004) en el caso de la transfección con pCMV-PrPm (figura derecha).

Una vez comprobada su especificidad, los plásmidos fueron utilizados para inmunizar ratones 129P2/Ola Hsd (que expresan la proteína PrP<sup>C</sup> constitutivamente). Concretamente, 8 animales fueron inmunizados con pCMV-PrPh, 8 con pCMV-PrPm y 8 con el plásmido pCMV sin inserto alguno (control negativo del ensayo). Los sueros obtenidos 6 semanas tras la última inmunización fueron testados mediante la técnica de ELISA para determinar la presencia de anticuerpos frente a la proteína priónica recombinante murina. Los resultados obtenidos se han representado en la figura 12, donde puede observarse que ninguno de los animales inmunizados con pCMV-PrPm fue capaz de inducir una respuesta de anticuerpos detectable frente a la proteína del prión (Figura 12 A), muy posiblemente debido a que la proteína expresada en la vacuna se reconoce como una proteína propia. En contraposición, al menos tres de los ocho animales inmunizados con pCMV-PrPh fueron capaces de generar una potente respuesta de anticuerpos capaces de reconocer tanto la proteína del prión humana (no mostrado) como la proteína murina (Figura 12B).



**Figura 12: Resultados del ELISA utilizando los sueros obtenidos tras inmunizar ratones 129P2/Ola Hsd con pCMV-PrPm (A), pCMV-PrPh (B) y pCMV (línea discontinua en A y B). El antígeno utilizado para tapizar las placas del ELISA fue proteína PrP recombinante murina semipurificada expresada en *E. coli*.**

#### **4.2. Caracterización de la capacidad adyuvante del péptido señal (sp) del prión humano en protocolos de vacunación con ADN frente al virus de la fiebre aftosa.**

Como acabamos de describir, la vacunación con pCMV-PrPh expresando la variante normal del prión humano resultó muy eficiente, sobre todo a la hora de inducir una respuesta de anticuerpos (Figura 12B), a pesar de su gran similitud con el prión murino. Una posible explicación a este fenómeno se debe a la existencia en esta molécula de un péptido señal muy eficiente a la hora de transportar la proteína humana a la superficie celular, lo que permite su interacción con las células B.

Partiendo de esta hipótesis decidimos utilizar el péptido señal del PrPh como un transportador de epítopos inmunogénicos de otro patógeno, en este caso del Virus de la Fiebre Aftosa (VFA). Los epítopos escogidos fueron dos epítopos T-CD4<sup>+</sup>, ubicados en la proteína no estructural 3A y en la proteína estructural VP4, respectivamente y un epítipo B, principal determinante del VFA frente al que se desarrollan anticuerpos neutralizantes.

Así pues, se obtuvo el plásmido pCMV-spBTT, que expresa los epítopos B y T del VFA fusionados en tándem (BTT) justo tras el péptido señal (sp) del PrPh. Los

demás plásmidos utilizados en un primer experimento de vacunación fueron el plásmido pCMV-BTT, codificando los epítomos BTT del VFA por sí solos y el plásmido vacío pCMV como control negativo del ensayo. Finalmente, un grupo de animales (tanto de ratones como de cerdos) fue inmunizado con la vacuna inactivada clásica (ver materiales y métodos).

A pesar de que el ratón no es el huésped natural del VFA, sí es un modelo ideal para ensayar nuevas versiones vacunales (Collen et al., 1989; Shi et al., 2007). De aquí que inicialmente nos planteáramos un experimento de vacunación utilizando ratones no singénicos Hsd:ICR (CD1). 13 ratones se inmunizaron con pCMV, 12 animales con pCMV-BTT y 4 con pCMV-spBTT. 2 semanas tras la tercera y última inmunización, los animales fueron sangrados y sus sueros utilizados para la realización de un ensayo de neutralización frente al VFA así como para detectar anticuerpos específicos mediante ELISAs específicos.

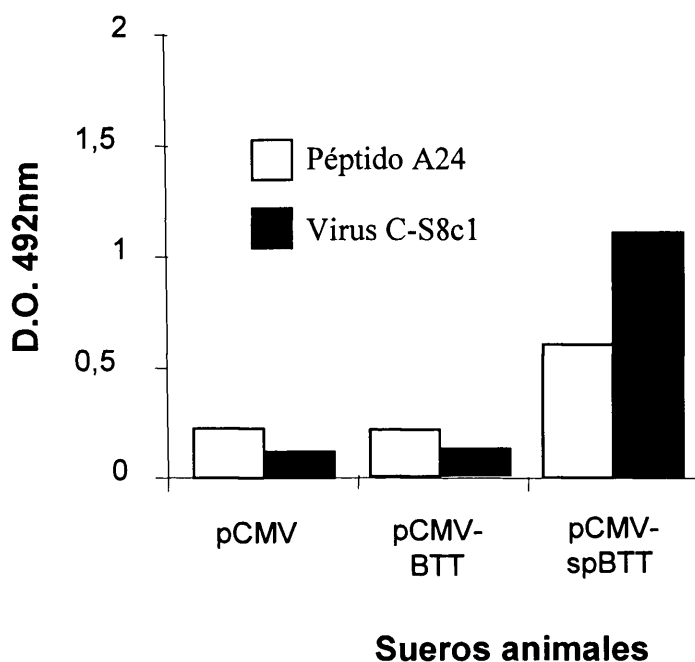
Los resultados de la detección de anticuerpos neutralizantes se representan en la tabla 9. Puede observarse que mientras que todos los animales inmunizados con el virus inactivado (5/5) desarrollaban elevados títulos de anticuerpos neutralizantes, ninguno de los ratones inmunizados con el plásmido pCMV-BTT (0/12) parecía responder a la vacuna. En contraposición, un 25% (1/4) de los ratones inmunizados con pCMV-spBTT respondían dando lugar a anticuerpos neutralizantes frente al VFA, siendo responsable de este porcentaje, la fusión del péptido señal de la molécula del prión a los epítomos BTT del virus.

Inóculo	NS/ número ratones	Título NS
pCMV	0 / 13	---
pCMV-BTT	0 / 12	---
pCMV-spBTT	1 / 4	1.6
BEI-C-S8c1 inactivado	5 / 5	> 2.3

NS: Seroneutralización.

**Tabla 9: Número de animales y títulos de anticuerpos neutralizantes obtenidos tras la inmunización de ratones Hsd:ICR (CD1) con los plásmidos pCMV, pCMV-BTT y pCMV-spBTT. Como control positivo, un grupo de animales fue inoculado con el virus C-S8c1 inactivado químicamente (BEI).**

La realización de un ELISA específico tanto frente al péptido A24 (con la misma secuencia de aminoácidos que el sitio B contenido en las vacunas de ADN) como frente al virus C-S8c1, permitió confirmar estos resultados, detectándose anticuerpos específicos únicamente en el suero positivo a neutralización, que corresponde a un animal vacunado con pCMV-spBTT (Figura 13).



**Figura 13** Resultados del ELISA específico frente al péptido A24 de FMDV (blanco) y frente al virus FMDV (negro) utilizando sueros individuales de ratones inmunizados con pCMV, pCMV-BTT y pCMV-spBTT. Los sueros fueron obtenidos 2 semanas tras la tercera última inmunización y utilizados a una dilución 1:35 en PBS.

De este modo, podríamos concluir que pCMV-spBTT es capaz de inducir anticuerpos neutralizantes que, como cabría esperar, resultaría protectoro frente al desafío con el VFA (van Bakkum, 1969). Estos resultados permiten ser optimista en cuanto a su posible utilización en protocolos experimentales de vacunación en uno de los huéspedes naturales del virus, el cerdo.

Así pues, 4 cerdos Landrace x Large White fueron inmunizados con pCMV-BTT, expresando los epítomos del VFA sólo y 4 más se vacunaron con pCMV-spBTT, expresando los epítomos del VFA fusionados al péptido señal del prión. Como control negativo y positivo del ensayo, 2 cerdos se inmunizaron con el plásmido pCMV sin inserto y un cerdo más se inmunizó con la vacuna de virus inactivado, respectivamente.



21 días tras la última inmunización, los cerdos se infectaron con una dosis de  $5 \times 10^4$  ufp del VFA cepa C-S8c1 para a continuación hacer tanto, un seguimiento diario de la sintomatología y de los signos clínicos de la enfermedad (Figura 14), como una comparación de las lesiones encontradas *post mortem*.

Grupo	Número animal	Días post desafío								
		1	2	3	4	5	7	8	9	10
pCMV	1									
	2									
BEI-C-S8c1	3									
pCMV-BTT	4									
	5									
	6									
	7									
pCMV-spBTT	8									
	9									
	10									
	11									

**Figura 14:** Representación esquemática de la severidad de los signos clínicos típicos de fiebre aftosa manifestados en los cerdos inmunizados con pCMV-BTT, pCMV-spBTT, pCMV y BEI-C-S8c1 durante 10 días tras el desafío con el VFA. Las tonalidades más claras indican signos clínicos suaves frente a las oscuras que indican una sintomatología más severa. Como control sin sintomatología fue incluido el cerdo número 3 que había sido inmunizado con la vacuna inactivada previamente al desafío.

Los cerdos control inmunizados con el plásmido pCMV, comenzaron a desarrollar la sintomatología y signos clínicos dentro de las 48 horas post infección (fiebre y vesículas en las patas). En los siguientes días desarrollan lesiones también en hocico y boca y los animales sufrieron anorexia y cojera. A partir del día 7 los cerdos inmunizados con pCMV experimentaron una mejoría hasta su casi total recuperación a día 10, en que fueron sacrificados. En contraposición, el animal vacunado con el virus inactivo no sufrió ni el más leve síntoma de la enfermedad tras el desafío con el VFA.

Sorprendentemente, todos los cerdos inmunizados con pCMV-BTT, no sólo no quedaron protegidos sino que además mostraron una clara exacerbación de los signos clínicos desde el mismo momento de su aparición dentro de las 48 horas post infección,

observándose una mayor presencia de vesículas en las patas y boca. La severidad en la sintomatología observada se prolongó en el tiempo hasta el día 10 en que los animales fueron sacrificados. La severidad de la enfermedad llegó hasta tal punto que uno de los animales, el cerdo número 6, murió a día 5 post infección, fruto de las graves lesiones producidas durante la infección.

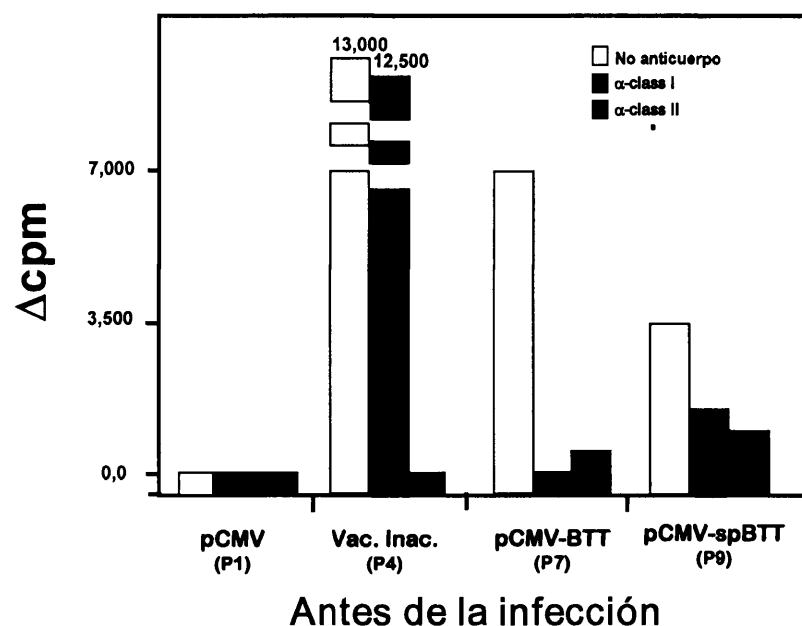
Finalmente, el 100% de los cerdos vacunados con pCMV-spBTT, tuvieron síntomas mucho más leves de la enfermedad, observándose tanto una reducción en el número como en el tamaño de las vesículas encontradas en patas y boca, respecto a los cerdos control inmunizados con pCMV. Además en el 50% de ellos (2/4) se observó un retraso de aproximadamente 24 horas en la aparición de los síntomas clínicos de la enfermedad.

La indiscutible relación que existe entre la inducción de anticuerpos neutralizantes y la protección frente al VFA (van Bekkum, 1969), hizo que en un principio enfocáramos nuestros primeros experimentos a medir éstos a partir del suero extraído de los animales 3 semanas tras la última inmunización y utilizando un ensayo de neutralización del VFA en monocapa (ver materiales y métodos). De una manera similar a lo observado en ratón (Tabla 9), únicamente uno de todos los animales vacunados fue capaz de generar una respuesta de anticuerpos neutralizantes, coincidiendo de nuevo con uno de los 4 animales (25%) inmunizados con la construcción pCMV-spBTT (Figura no mostrada).

Estos resultados ratifican de un lado, la relevancia de los anticuerpos neutralizantes en protección frente al VFA pero por el otro, demuestra claramente que ha de existir uno o varios mecanismos alternativos de protección que expliquen la reducción en los síntomas observada en al menos 3 de 4 animales (75%) vacunados con pCMV-spBTT. Con el objetivo de desentrañar éstos, decidimos realizar un ensayo de linfoproliferación utilizando linfocitos purificados a partir de la sangre de los animales vacunados justo antes del desafío con el VFA, utilizando como estímulo  $10^5$  ufp del virus. Con el objetivo de definir si se trata de células T-CD8<sup>+</sup> o de células T-CD4<sup>+</sup>, las que proliferan específicamente, éstas se incubaron en ausencia o en presencia de anticuerpos monoclonales que bloquean, bien las moléculas de histocompatibilidad de clase I (anti-SLA I) o bien las moléculas de histocompatibilidad de clase II (anti-SLA II).

Los resultados obtenidos se representan en la figura 15.





**Figura 15.** Los cerdos se inmunizaron 2 veces con la vacuna inactivada (Vac. Inac. P4) o tres veces con los plásmidos pCMV (P1), pCMV-BTT (P5) o pCMV-spBTT (P9), y tres semanas tras la última dosis, se sangraron para medir la respuesta proliferativa de sus linfocitos de sangre en respuesta al VFA. Las respuestas proliferativas de los cerdos fueron medidas tanto en ausencia de anticuerpos (en blanco), como en presencia de anticuerpos anti-clase I (en gris) o anti-clase II (en negro). Los valores representados corresponden a la media de tres réplicas. Valores por debajo de 1000 Δcpm fueron considerados como negativos.

Como cabía esperar, antes del desafío no se observó respuesta alguna en los animales control inmunizados con pCMV, mientras que la vacuna inactivada indujo una clara respuesta celular restringida por clase II, lo que indica una típica respuesta T-CD4<sup>+</sup> cooperadora (Figura 15). En contraposición, la proliferación específica de las células T inducidas por la vacuna pCMV-BTT era inhibida al 100% por anticuerpos anti-clase I, indicativa de una respuesta T-CD8<sup>+</sup> citotóxicos (CTL). Finalmente la proliferación específica de las células T inducidas por la vacuna protectora pCMV-spBTT era inhibida únicamente al 50% por ambos anticuerpos: anti-clase I y anti-clase II, indicativo muy probablemente de la inducción ambos tipos de células T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>.

De todos estos resultados se pueden extraer varias conclusiones que demuestran la utilidad de la fusión del péptido señal del prión a epítopos de otros patógenos, en este caso, del VFA. Por un lado, hemos demostrado que la vacunación con ADN expresando epítopos B y T del VFA fusionados al péptido señal del prión es capaz de inducir anticuerpos neutralizantes y protectivos frente el virus. Por otro lado, esta misma vacuna

(pCMV-spBTT) facilita la presentación de epítomos T, tanto en Clase I como en Clase II, desembocando en una respuesta celular protectora. Finalmente, la vacunación con ADN expresando estos mismos minigenes por sí solos (pCMV-BTT) induce una respuesta celular que se inhibe al 100% con anticuerpos anti-Clase I que, en lugar de resultar protectora para el animal exacerba los síntomas de la enfermedad.

En resumen podríamos concluir que a la hora de diseñar una vacuna, resulta esencial no sólo desenmascarar los epítomos protectivos sino también los mecanismos implicados en protección.

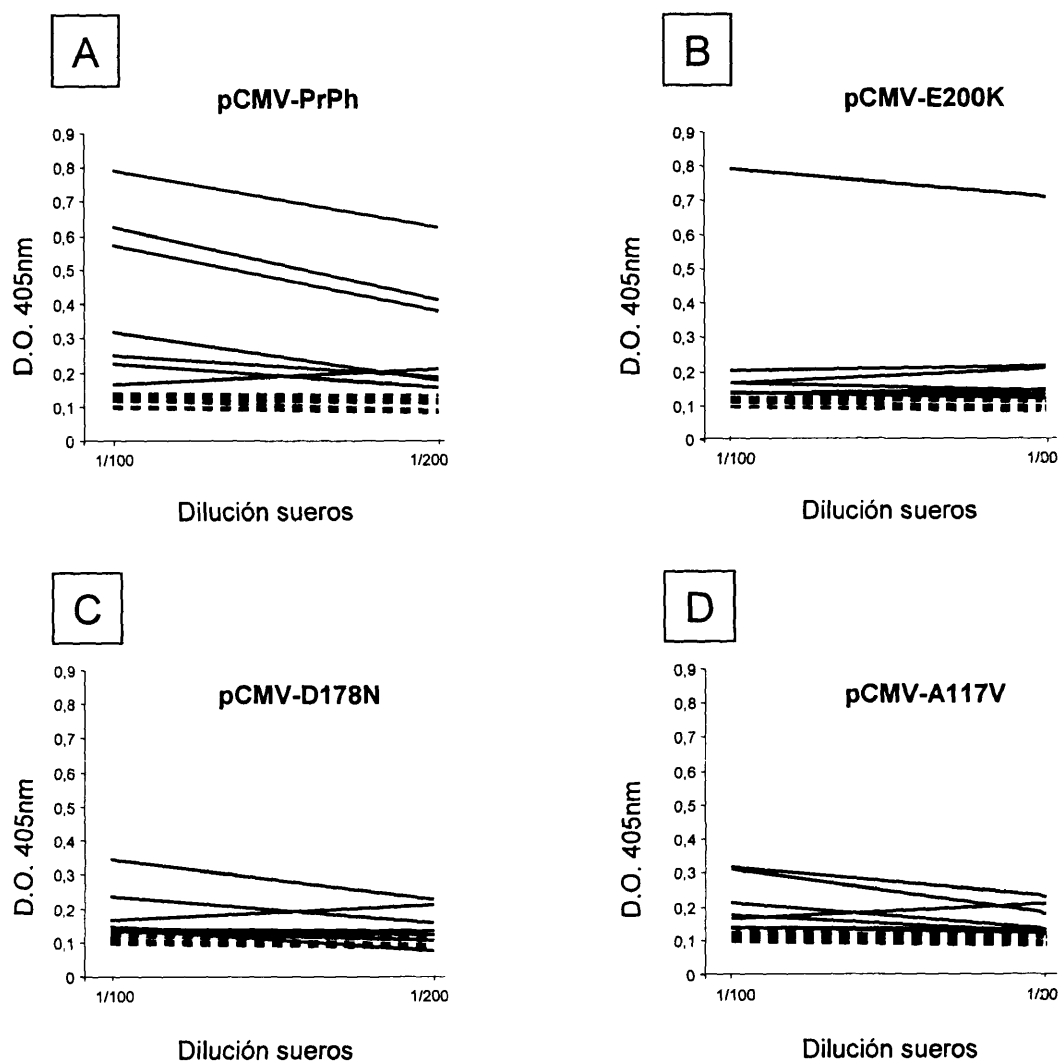
#### **4.3. Estudios de respuesta inmunológica frente a diferentes variantes de la proteína del prión.**

Como hemos visto en la primera sección de resultados, las vacunas ADN conteniendo el gen de la proteína del prión murino no son capaces de romper la tolerancia en ratones, mientras que pequeños cambios de secuencia en el gen humano (permiten que el antígeno sea reconocido como “extraño” y que se produzca una respuesta inmunológica específica contra la proteína del prión (Figura 12). Teniendo estos datos en cuenta, decidimos estudiar la inmunogenicidad de diversas variantes patogénicas de la PrP<sup>C</sup> humana. El objetivo de estos experimentos era estudiar si la presencia de cada una de estas mutaciones tenía o no un reflejo en su presentación antigénica y en la respuesta inmunológica inducida tras la vacunación con ADN en ratón, aprendizaje que en un futuro podría facilitar el desarrollo de nuevas metodologías diagnósticas que faciliten el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad e incluso la obtención de estrategias inmunopreventivas contra las EETs en humanos.

##### **4.3.1. Respuesta humoral o de anticuerpos frente al prión y sus “variantes patogénicas” tras la vacunación con ADN.**

Con esta hipótesis de partida, se inmunizaron ratones con el plásmido pCMV-PrPh, conteniendo el gen de la proteína del prión humano normal o con los plásmidos pCMV-E200K, pCMV-D178N, pCMV-A117V, expresando las variantes de la proteína priónica humana asociadas a la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD) familiar, Insomnio Familiar Fatal (IFF) y Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), respectivamente (8 ratones por grupo de inmunización). Como control negativo del ensayo se inmunizaron 8 animales con el plásmido pCMV. 6 semanas tras la última

inmunización los animales se sangraron y los sueros obtenidos fueron analizados mediante un ELISA específico frente a la proteína recombinante murina semipurificada tras su expresión en *E. coli* (Figura 16).



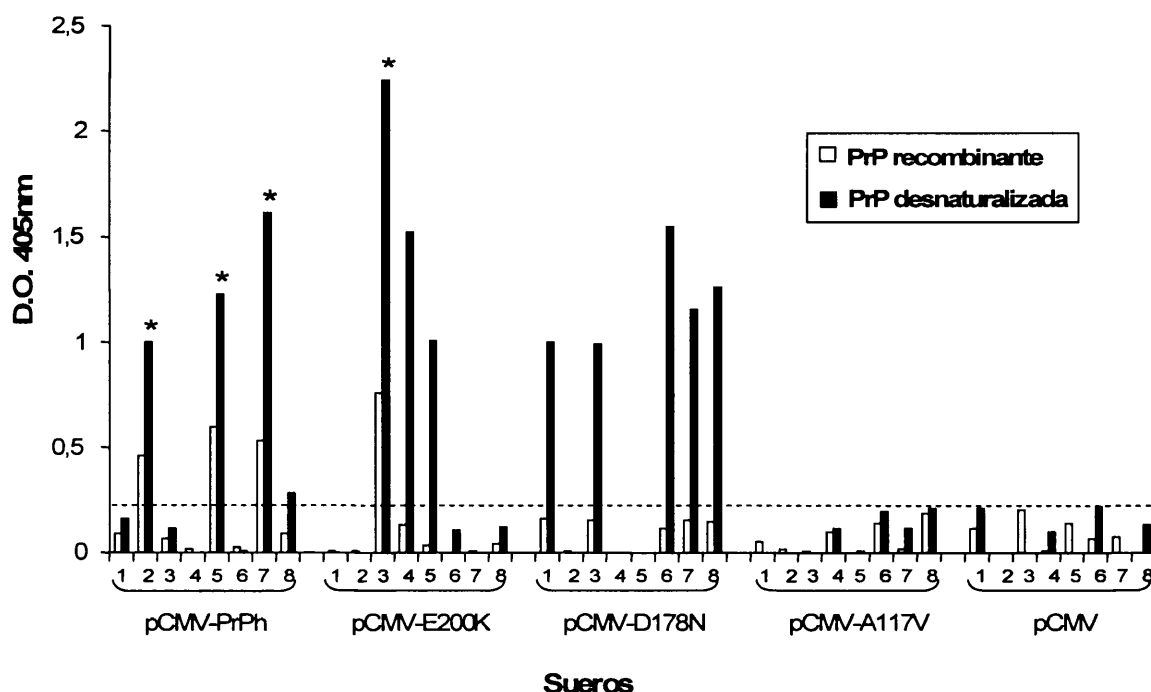
**Figura 16:** Resultados del ELISA utilizando los sueros obtenidos tras inmunizar ratones con pCMV-PrPh (A), pCMV-E200K (B), pCMV-D178N (C), pCMV-A117V (D) y el control negativo pCMV (líneas discontinuas en todos los paneles). En todos los casos se utilizó proteína PrP recombinante murina como antígeno para tapizar las placas del ELISA.

Como acaba de ser descrito, tres de los ocho animales inmunizados con pCMV-PrPh (el 33,6%), expresando el prión normal sin mutaciones, fueron capaces de inducir una clara respuesta de anticuerpos (A). En contraposición, de los 24 animales inmunizados con los plásmidos expresando las distintas mutaciones de la proteína del

prión humana, únicamente uno fue capaz de dar lugar a una respuesta de anticuerpos (el 4,1%), correspondiendo éste con un ratón vacunado con pCMV-E200K (B).

Así pues, un único cambio de aminoácido de la proteína del prión afecta no sólo a su estructura terciaria y a su localización intracelular (Capellari et al., 2000; Jin et al., 2000; Negro et al., 2001; Petersen et al., 1996; Singh et al., 1997; Zanusso et al., 1999) sino que también se ve afectada su presentación antigénica al sistema inmunológico, al menos a las células B.

Con el objetivo de caracterizar con más detalle el tipo de respuesta inducida, los sueros obtenidos tras la vacunación con cada una de las vacunas se utilizaron en un ELISA modificado, utilizando en este caso, la proteína del prión desnaturalizada en urea con el objetivo de exponer posibles epítomos lineales del prión que pudieran encontrarse “encriptados” en su conformación nativa. Como cabía esperar, aquellos sueros que resultaron positivos en un ELISA frente a la forma nativa del prión murino (Figura 17, en blanco), lo eran también frente a la forma desnaturalizada (Figura 17, en gris), siendo incluso mayores los valores de densidad óptica observados para la proteína desnaturalizada que para la nativa para aquellos sueros que reconocen ambas (\*). Sin embargo, sí que resultó sorprendente el hecho de que muchos sueros negativos frente a la proteína PrP murina nativa, resultaran altamente positivos para la proteína desnaturalizada. Así, los ratones 4 y 5 vacunados con pCMV-E200K y 5 de los 8 ratones vacunados con pCMV-D178N (>56%), inducían gran cantidad de anticuerpos que específicamente reconocían sólo epítomos B lineales del prión. En cualquiera de los casos, la inmunización con pCMV-A117V no provocó ninguna respuesta de anticuerpos específica frente a la molécula del prión.



**Figura 17:** Resultados del ELISA utilizando los sueros obtenidos tras inmunizar ratones con pCMV-PrPh, pCMV-E200K, pCMV-D178N, pCMV-A117V y el control negativo pCMV. Los antígenos utilizados para tapizar las placas del ELISA fueron la proteína del prión recombinante murina en forma nativa (blanco) y desnaturalizada (gris). Todos los sueros fueron utilizados a una dilución 1/50. Los valores de D.O. por debajo de la línea discontinua se consideraron negativos.

Con todos estos resultados, se puede afirmar que la inmunización de ratones con vacunas ADN que codifican por distintas variantes de la proteína del prión humana provoca respuestas inmunológicas cuantitativa y cualitativamente diferentes, siendo distinta para cada una de las mutaciones testadas (resultados resumidos en tabla 10). Por un lado, mientras que en el 38% de los ratones vacunados con pCMV-PrPh se detectan concomitantemente tanto anticuerpos conformacionales como lineales, únicamente el 4% de todos los animales vacunados con formas mutadas del prión inducen una respuesta de anticuerpos capaces de reconocer al prión en su conformación nativa. Cuando esta respuesta se subdivide según cada mutación, únicamente E200K es capaz de inducir anticuerpos contra la forma nativa del prión. Curiosamente, otro 25% de los ratones vacunados con pCMV-E200K y el 63% de los ratones vacunados con pCMV-D178N presentan elevados títulos de anticuerpos capaces de reconocer únicamente epítomos lineales del prión. Finalmente, la vacunación con pCMV-A117V, no fue efectiva en ningún caso a la hora de inducir una respuesta humoral detectable en los animales.

Plásmido inmunizado	Antígeno empleado	
	Proteína PrP nativa	Proteína PrP desnaturalizada
pCMV-PrPh	38%	38%
pCMV-PrP*	4%	33%
pCMV-E200K	13%	38%
pCMV-D178N	0%	63%
pCMV-A117V	0%	0%

**Tabla 10: Porcentaje de animales positivos para anticuerpos específicos contra el prión tras la inmunización con las construcciones pCMV-PrPh, pCMV-E200K, pCMV-D178N y pCMV-A117V con títulos de anticuerpos positivos frente a los antígenos PrP murina (nativa) y PrP desnaturalizada. PrP\* representa los valores medios de porcentajes de anticuerpos generados por las formas mutadas de la PrP humana.**

De una manera muy resumida, los animales inmunizados con pCMV-PrPh parecen generar un repertorio de anticuerpos muy completo que comprende tanto el reconocimiento epítomos conformacionales como lineales mientras que la inmunización con las variantes patogénicas de la proteína del prión humana parecen inducir mayoritariamente la generación de anticuerpos frente a epítomos lineales, detectables únicamente cuando la proteína se encuentra en forma desnaturalizada. Además de la diferente presentación antigénica de la proteína del prión humana “normal” respecto a sus variantes mutadas “patogénicas”, nuestros resultados apuntan a su vez a diferencias en la presentación del antígeno dependiendo de la mutación estudiada.

#### **4.3.2. Respuesta celular citotóxica (CTL) frente al prión y sus “variantes patogénicas” tras la vacunación con ADN.**

Con el fin de poder evaluar más en profundidad las diferencias existentes tanto en la presentación antigénica de las diversas mutaciones patogénica humanas del prión como en la respuesta inmunológica inducida *in vivo* tras la vacunación con ADN, decidimos extender nuestros estudios a la respuesta inmunológica celular.

Desgraciadamente, en el momento en que se comenzaron estos estudios, no se conocía prácticamente nada sobre la respuesta inmunológica que inducía el prión, menos aún en lo que se refiere a posibles epítomos T reconocidos por el sistema inmunológico. De aquí, que para poder medir la respuesta celular inducida por cada una de las variantes de la proteína del prión, decidiéramos generar una serie de moléculas **quiméricas** del prión conteniendo epítomos B y T inmunogénicos ya caracterizados de

otros patógenos (del mismo modo a lo descrito para epítomos del VFA en el apartado 3.4.4. de resultados). La fusión de estos epítomos a las variantes patogénicas de la molécula del prión en posiciones que no interfieran con su función, permitiría estudiar los efectos que cada una de las mutaciones en el prión provocaban en la respuesta inmunológica inducida. De entre los epítomos inmunogénicos fusionados en tándem (ET) y descritos en la sección de materiales y métodos, se encuentra el epítomo GP<sub>33</sub>, un epítomo T-CD8<sup>+</sup> (CTL) del virus de la coriomeningitis linfocitaria (LCMV) localizado en la glicoproteína de LCMV (posiciones 33-41). GP<sub>33</sub> se presenta por la molécula H2<sup>b</sup> del CMH I tras el procesamiento de ésta en el proteasoma de la célula presentadora de antígeno. La inducción de una respuesta eficiente frente a GP<sub>33</sub> es capaz de conferir protección frente al LCMV en ratones C57 BL/6JOlaHsd (Whitton et al., 1993).

Los plásmidos generados como fusión de los epítomos en tándem (ET) al amino terminal de cada una de las moléculas del prión (ver en materiales y métodos), fueron los siguientes:

- pCMV-PrPhET: codifica por el gen del prión humano normal fusionado a los ET.
- pCMV-E200KET, codifica por la variante E200K fusionado a los ET.
- pCMV-D178NET, codifica por la variante D178N fusionado a los ET.
- pCMV-A117VET, codifica por la variante A117V fusionado a los ET.

Como controles negativos para esta serie de experimentos fueron diseñados dos plásmidos diferentes, uno conteniendo el tándem de epítomos por sí solos (pCMV-ET) y el otro conteniendo los ET fusionados únicamente a la secuencia del péptido señal de la molécula del prión (sp) (pCMV-spET).

Se procedió a realizar un experimento de vacunación con ADN *in vivo*, utilizando en este caso ratones C57 BL/6JOlaHsd. El objetivo de este experimento era poder comparar la respuesta protectora inducida frente al LCMV tras la vacunación con los distintos plásmidos. Cualquier diferencia en protección únicamente podría ser adscrita a la respuesta celular T-CD8<sup>+</sup> inducida contra el epítomo GP<sub>33</sub>, único determinante protector frente al LCMV contenido en la vacuna.

Así pues, 4 ratones C57 BL/6JOlaHsd se inmunizaron con cada uno de los plásmidos diseñados, incluyendo un grupo control negativo inmunizado con pCMV y un grupo control positivo pre-vacunado con una dosis subletal del LCMV (Rodriguez et al., 1997).

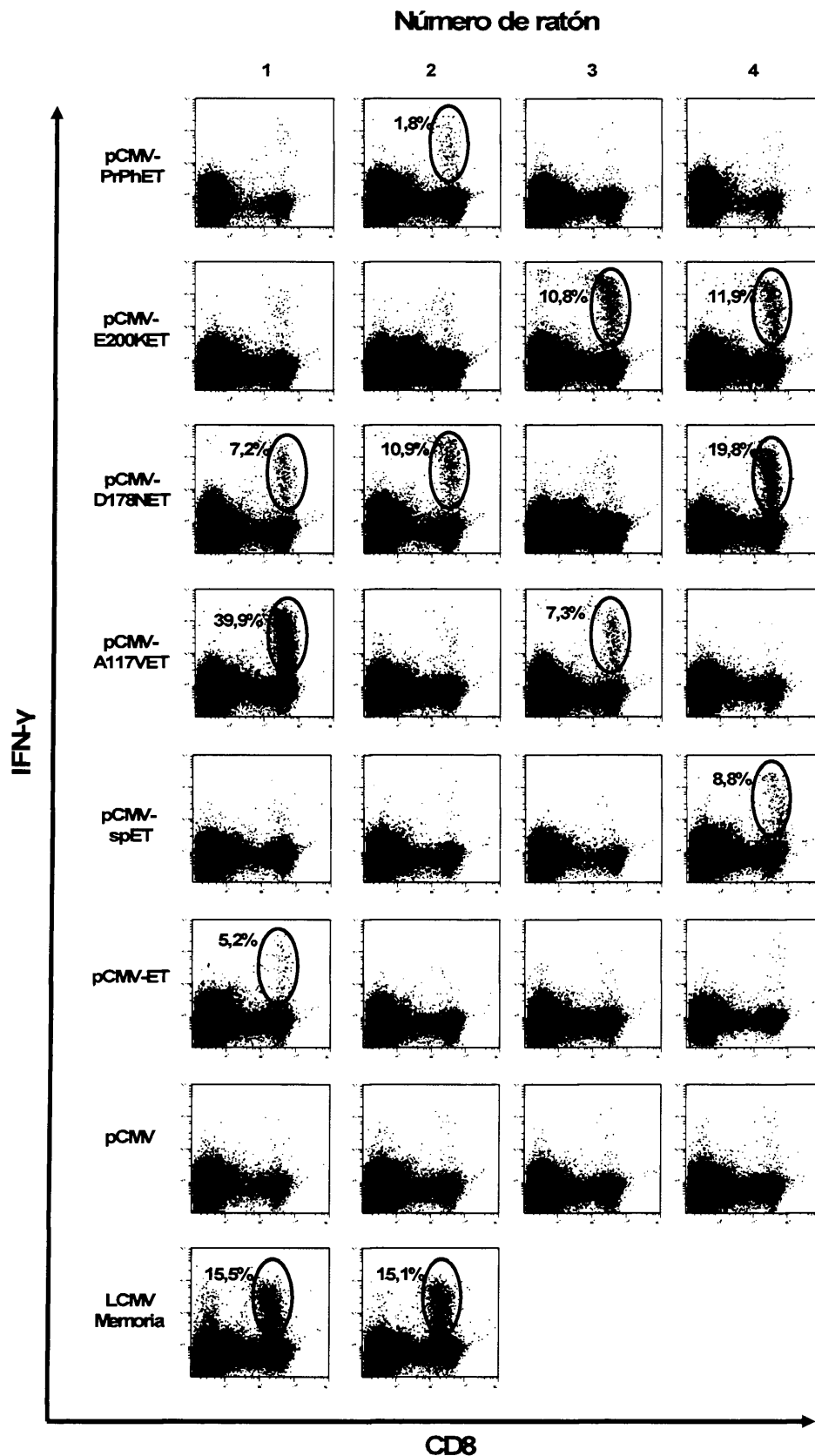
Tras la última inmunización, todos los ratones fueron sangrados con el fin de estudiar la respuesta de anticuerpos frente a la proteína del prión. Cada una de las

construcciones se comportó como cabía esperar (Figura 17). Mientras que el 50% de los animales vacunados con pCMV-PrPhET inducían anticuerpos capaces de reconocer el prión en su forma nativa, las variantes mutadas provocaron la inducción de anticuerpos que reconocían mayoritariamente epítomos lineales del mismo (resultados no mostrados).

Con el objetivo de estudiar la respuesta T-CD8<sup>+</sup> inducida por las vacunas, así como el grado de protección conferido contra el LCMV, todos los animales fueron desafiados con  $2 \times 10^5$  ufp del virus LCMV cepa Armstrong, un mes tras la última inmunización, para 4 días tras el desafío ser sacrificados. Tras el sacrificio, el bazo de cada animal fue dividido en dos secciones: una mitad para calcular la carga viral, y la otra mitad para realizar los ensayos de medición de la respuesta T específica mediante un ensayo de ICCS (ver en materiales y métodos).

De una manera resumida, los esplenocitos de cada animal fueron estimulados durante 6 horas en presencia del péptido GP<sub>33</sub> específico o de un péptido irrelevante, añadiendo BFA al cultivo para favorecer la acumulación intracelular de las citoquinas (ver materiales y métodos). La posterior tinción extracelular para la molécula CD8 e intracelular de Interferón gamma (ICCS), reveló el porcentaje de células T-CD8<sup>+</sup> específicas frente al estímulo utilizado. Los resultados se muestran en la figura 18.



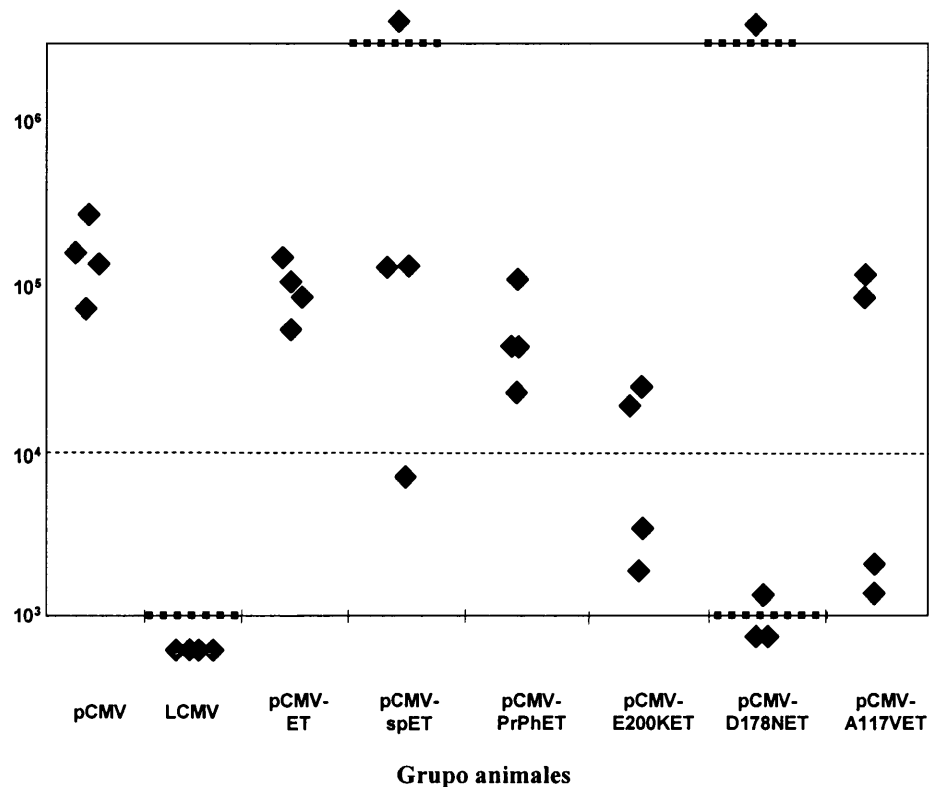


**Figura 18:** Porcentaje de células TCD8<sup>+</sup> que expresan IFN- $\gamma$  en respuesta al estímulo específico (círculos), tras la inmunización de ratones C57 BL/6JOlaHsd con los diferentes plásmidos señalados en la figura. Como control positivo del ensayo, se utilizaron dos ratones previamente infectados con una dosis subletal del virus LCMV.

Como cabía esperar, los animales vacunados con el plásmido sin inserto, resultaron negativos para el ensayo, ya que 4 días tras la infección con LCMV es demasiado pronto como para que se pueda detectar una respuesta T-CD8<sup>+</sup> específica. En contraposición, alrededor del 15% de las células T-CD8<sup>+</sup> de los ratones previamente vacunados con LCMV (control positivo), respondían específicamente al estímulo específico (LCMV memoria).

Tomando los datos en su conjunto, cabe destacar que mientras sólo 1 de los 4 animales inmunizados con la PrP humana sin ninguna mutación dio lugar a una respuesta T-CD8<sup>+</sup> positiva (25%), el 60% de los vacunados con los plásmidos que expresaban las variantes mutadas, respondieron positivamente. Por grupos, se pudo comprobar que las vacunas que contenían las mutaciones A117V y E200K fueron capaces de inducir una clara respuesta T-CD8<sup>+</sup> en el 50% de los ratones, mientras que la vacuna conteniendo la mutación D178N lo hizo en el 75% de ellos (3/4).

La inducción de respuestas CTL específicas frente al LCMV y la protección frente al mismo están íntimamente ligadas (Whitton et al., 1993) por lo que cabría esperar una correlación entre ambas para el caso del protocolo de vacunación recién descrito. Con el objetivo de medir la protección inducida por nuestras vacunas, la otra mitad del bazo utilizado en el experimento anterior, se utilizó para calcular la carga viral existente a día 4 tras la infección. Para ello, los bazos fueron macerados y utilizados como inóculo sobre monocapas de células Vero cubiertas con agarosa, para 5 días después calcular las unidades formadoras de placas (ufps) por cada gramo de bazo (Figura 19).



**Figura 19: Ratones C57 BL/6JOLaHsd fueron inmunizados con pCMV-PrPh ET, pCMV-E200KET, pCMV-D178NET, pCMV-A117VET, pCMV-spPrPhET, pCMV-ET y pCMV. Todos los animales fueron desafiados con LCMV (incluyendo un grupo previamente vacunado con una dosis subletal del LCMV), 4 días tras el desafío fueron sacrificados y los bazo triturados y utilizados como inóculo infeccioso sobre células Vero. El resultado de carga viral se muestra como número de unidades formadoras de placas (ufp) por cada gramo de tejido. La línea discontinua indica el umbral por debajo del cual se considera como totalmente protegido a un animal.**

Como puede observarse, en general parece existir una muy buena correlación entre inducción de una respuesta T-CD8<sup>+</sup> y protección. Así, tanto tras la inmunización con el plásmido sin inserto (pCMV) como la vacunación con la vacuna que codifica los epítomos en tándem por sí solos (pCMV-ET) no indujo ningún tipo de protección (comparten la misma cantidad de virus por gramo de tejido), correlacionando con la ausencia total de respuesta T-CD8<sup>+</sup> específica. En el otro extremo, los animales pre vacunados con LCMV quedaban protegidos al 100% sin que pudiera detectarse virus en el bazo, lo que corresponde con una gran respuesta específica de células T-CD8<sup>+</sup>.

Curiosamente, ninguno de los animales vacunados con pCMV-PrPhET (codificando la molécula prión humana normal sin ningún tipo de mutación fusionada a los epítomos en tándem), resultó sólidamente protegido, muy probablemente debido a los bajos niveles de células T-CD8<sup>+</sup> inducidas (Figura 18), resultando ésta incluso

inferior a la obtenida mediante la fusión del péptido señal a los ET (ver carga viral en el grupo pCMV-spET en figura 19). Mucho más sorprendente resultaron los datos obtenidos tras la vacunación con las distintas variantes “patogénicas” de la proteína, que muestran una correlación del 100% con los resultados de medición de respuesta T específica (comparar Figuras 18 y 19). Así, el 50% de los animales inmunizados con pCMV-E200KET o con pCMV-A117VET quedaron sólidamente protegidos, ascendiendo el porcentaje al 75% de los animales inmunizados para el caso de la vacunación con pCMV-D178NET. Este último caso resulta especialmente interesante ya que la protección fue total en 2 de los 4 animales, no pudiendo detectarse virus en el bazo, implicando una óptima presentación de este epítipo a las células T-CD8<sup>+</sup>, algo difícil de obtener con vacunas ADN y minigenes (An et al., 2000).

A modo de resumen, cabría afirmar que tras la inmunización con ADN, existe una presentación antigénica diferencial entre las distintas variantes mutadas de la proteína del prión, consecuencia de la cual la respuesta inmunológica humoral y celular a la que dan lugar es diferente. Así, mientras que la variante normal del prión induce muy eficientemente anticuerpos, las variantes “patogénicas” del prión inducen más eficientemente una respuesta T-CD8<sup>+</sup> específica.

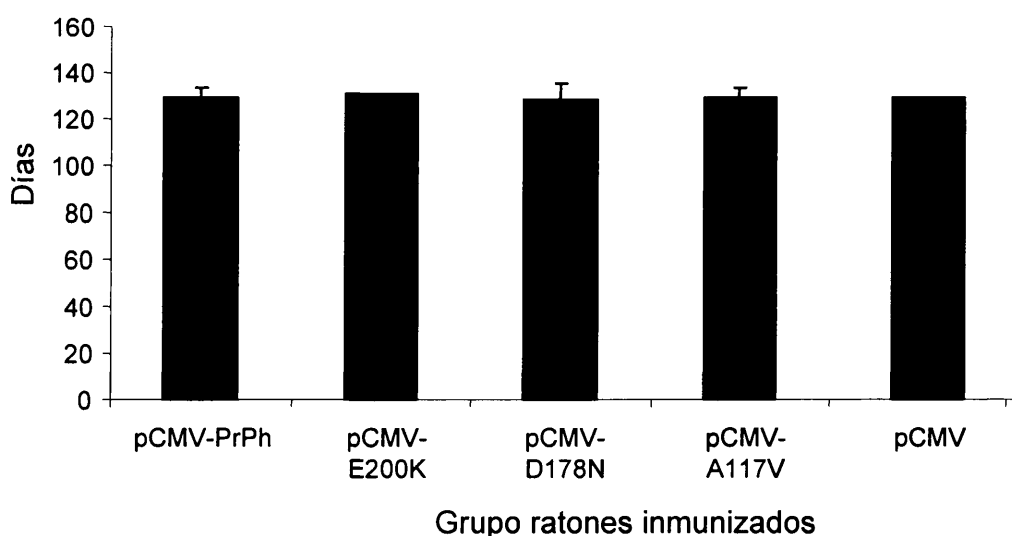
#### **4.3.3. Estudios de protección frente a diferentes variantes de la proteína del prión.**

Durante el transcurso de esta tesis, Ishibashi y colaboradores publicaron un trabajo muy interesante utilizando la vacunación como estrategia para controlar la infección intraperitoneal por priones. Estos autores, demostraron que los ratones quedaban completamente protegidos tras la inmunización con proteína bovina, es decir, un prión heterólogo (Ishibashi et al., 2006).

Teniendo en cuenta estos resultados tan sorprendentes de protección heteróloga, decidimos evaluar la capacidad protectora de nuestras vacunas ADN expresando las diversas variantes del prión humano, capaces como hemos comprobado anteriormente de inducir una respuesta inmunológica diferencial tras su inoculación como vacunas ADN. Con el objetivo de evitar interpretaciones erróneas en el seguimiento de la sintomatología clínica, decidimos realizar el desafío intracraneal con un inóculo infeccioso adaptado a ratón, modelo con el que poseemos amplia experiencia en el laboratorio (Castilla et al., 2005).

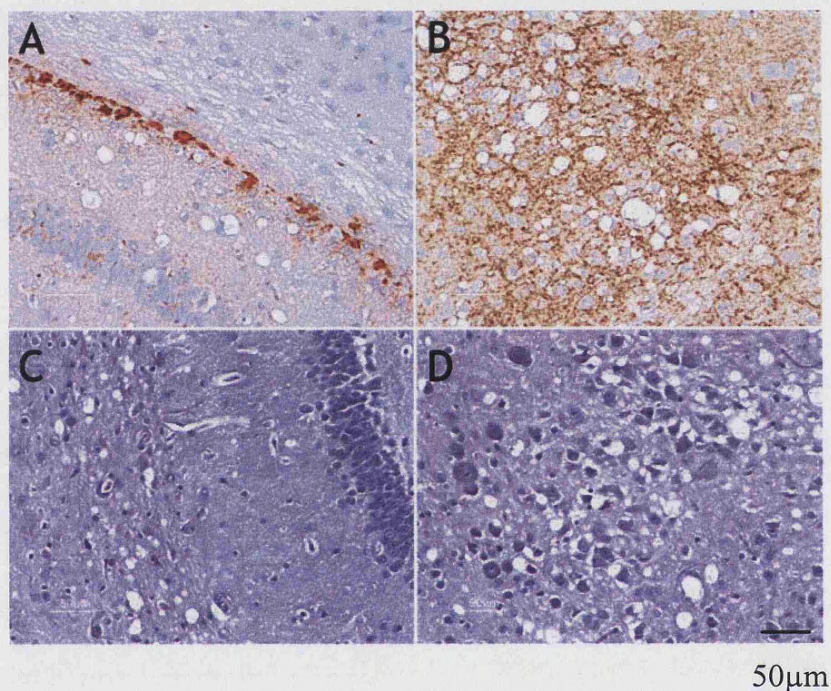
Así, 6 grupos con 4 ratones 129P2/OlaHsd cada uno, fueron inmunizados con los plásmidos: pCMV-PrPh (expresando el prión humano normal), pCMV-E200K, pCMV-D178N, pCMV-A117V (expresando las diversas variantes) y un grupo control negativo inmunizado con el plásmido sin inserto pCMV. 6 semanas tras la última inmunización fueron infectados intracranealmente con una dosis letal del inóculo infeccioso adaptado al ratón (Castilla et al., 2005). Los signos clínicos de los animales fueron evaluados semanalmente por un observador objetivo (“observación a ciegas”) y por razones éticas, los animales en fase terminal fueron sacrificados.

A pesar de la potente respuesta inmunológica inducida por alguno de los plásmidos utilizados, ninguna de las vacunas fue capaz de proteger a los ratones frente al desafío intracraneal con el prión infeccioso. Así, no se observaron diferencias ni en la severidad de los signos clínicos, ni en los tiempos de incubación desde el inicio de la infección hasta la aparición de los primeros síntomas entre los grupos de inmunización. Del mismo modo, todos los animales acabaron sucumbiendo entre los días 125 y 135 tras el desafío, independientemente de la vacuna recibida (Figura 20).



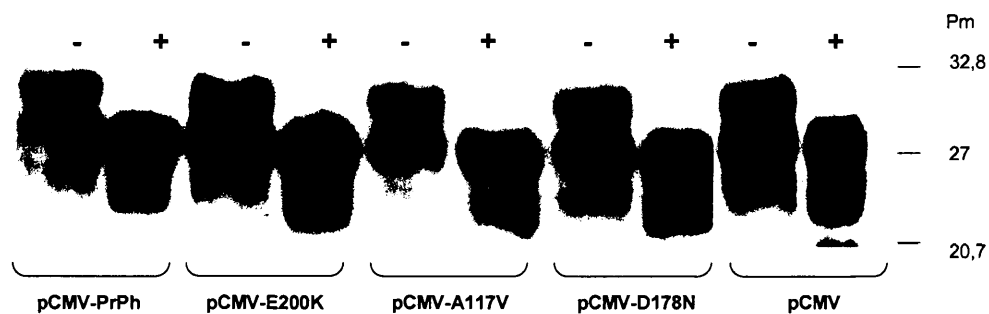
**Figura 20:** Ratones 129P2/OlaHsd fueron inmunizados con las construcciones pCMV-PrPh, pCMV-E200K, pCMV-D178N, pCMV-A117V y pCMV y posteriormente fueron desafiados intracranealmente con una dosis letal de inóculo de prión infeccioso adaptado a ratón (ver materiales y métodos). En el gráfico de barras se representan los días transcurridos desde la infección de los animales hasta el día de su sacrificio (estado terminal de la enfermedad), indicándose así mismo la desviación estándar existente dentro de cada grupo.

A pesar de no observar diferencias en la supervivencia entre los distintos grupos, se realizaron estudios inmunohistoquímicos para comparar la acumulación de proteína infecciosa en los encéfalos de los animales inmunizados con los distintos plásmidos (Figura 21 A y B), así como un estudio histológico comparativo de las lesiones (Figura 21 C y D). Correlacionando con la ausencia de protección observada, no se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos de animales.



**Figura 21:** Inmunohistoquímica para la detección de PrP<sup>Sc</sup> (MAb 6H4, Prionics 1:3000) en hipocampo (A) y medula oblongada (B). En hipocampo se observan estructuras inmunoteñidas de tipo placa (A) y, en medula oblongada (B), se observan patrones de tinción de tipo granular y punteado en neuropilo. Tinción de hematoxilina eosina mostrando evidentes lesiones espongiformes en hipocampo (C) y medula oblongada (D).

Para distinguir la proteína priónica total de la proteína infecciosa acumulada, los extractos de encéfalo se incubaron en ausencia (Figura 22 (-)) o en presencia de PK (Figura 22 (+)) que permite detectar únicamente la proteína infecciosa resistente a proteasas.



**Figura 22:** Western Blot de los encéfalos de animales 129P2/OlaHsd inmunizados con pCMV-PrPh, pCMV-E200K, pCMV-D178N, pCMV-A117V y pCMV y posteriormente desafiados con inóculo de príon infeccioso, tomadas post mortem (muestras de un animal representativo para cada grupo). El símbolo (-) indica proteína del príon infecciosa insoluble sin tratar con PK, (+) indica proteína del príon infecciosa tratada con PK. El anticuerpo específico utilizado fue el 2A11 a una dilución 1:3000 en PBS (Brun et al., 2004).

Así pues, tanto los estudios histológicos como el Western Blot realizados post-mortem confirman la ausencia de protección frente al desafío intracraneal por parte de las vacunas ADN ensayadas hasta el momento, a pesar de la potente respuesta inmunológica inducida por las vacunas. Por un lado, los anticuerpos inducidos por la vacunación con pCMV-PrPh no resultaron eficientes, a pesar de reconocer la proteína del príon en su forma nativa. Por el otro lado, la vacunación con el resto de los plásmidos pCMV-E200K, pCMV-D178N y pCMV-A117V, resultó ineficiente contra el desafío intracraneal a pesar de la potencial inducción de una respuesta CTL específica y/o de inducir una potente respuesta de anticuerpos que reconocen epítopos lineales del príon. La falta de protección frente al desafío con el príon infeccioso adaptado a ratón, podría estar relacionada con el hecho de haber utilizado vacunas "heterólogas" expresando secuencias del príon humano, limitación que nos encontramos en muchas ocasiones a la hora de diseñar vacunas frente a casi cualquier otro patógeno. Esta y otras hipótesis que permitan explicar la disparidad de nuestros con los previamente reportados (Ishibashi et al., 2006), se discutirán más adelante, en la sección de resultados.



#### **4.4. Estrategias de potenciación de la respuesta inmunológica frente a la proteína del prión.**

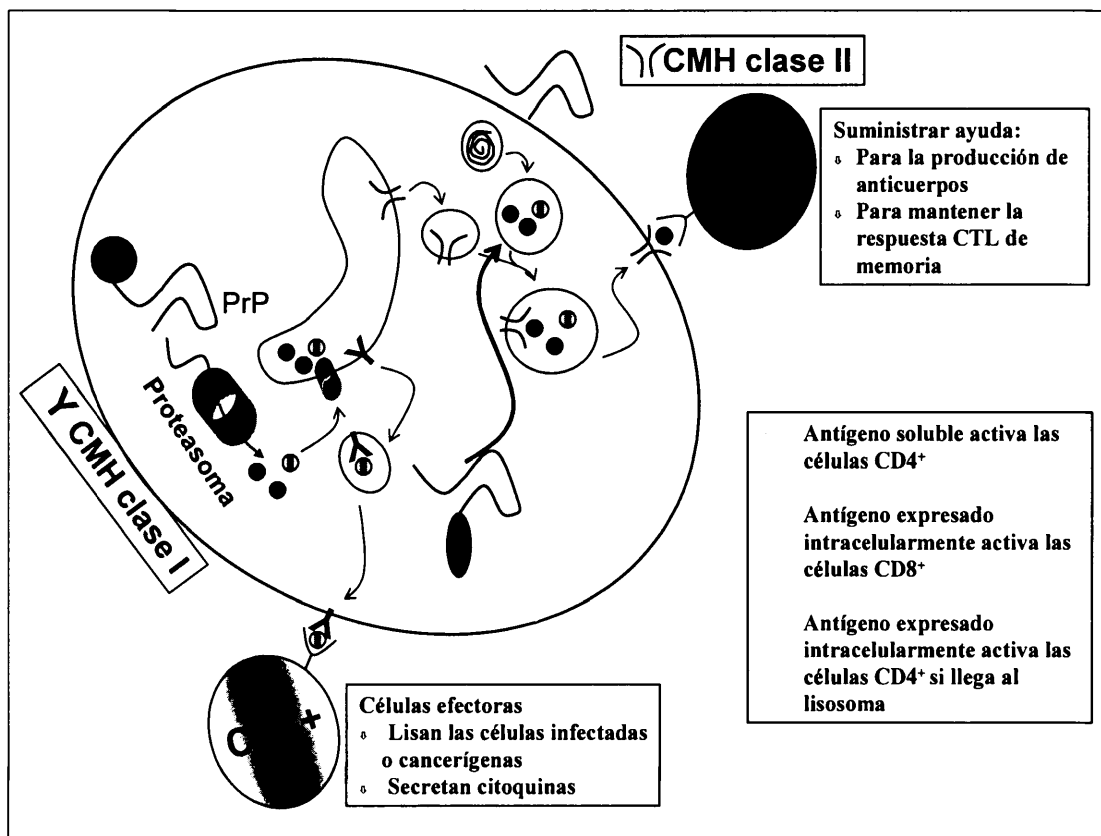
Como se ha descrito hasta el momento, la vacunación de ratones con pCMV-PrPm (expresando la proteína del prión murina) es incapaz de romper la barrera de la tolerancia e inducir una respuesta de anticuerpos frente a la proteína del prión (Figura 12 A), presumiblemente porque el antígeno expresado en la vacuna era reconocido como algo propio. Por otro lado, la vacunación de ratones con pCMV-PrPh expresando el prión humano normal o cualquiera de sus variantes mutantes no resultó eficiente a la hora de proteger frente al desafío intracraneal con el prión infeccioso adaptado a ratón, a pesar de inducir una potente respuesta inmunológica (Figura 18).

Con el objetivo de maximizar las posibilidades de éxito de protección frente al desafío con prión infeccioso murino, decidimos diseñar nuevas estrategias vacunales capaces de potenciar la respuesta inmunológica inducida en ratón contra el prión homólogo (de ratón). Las estrategias descritas a continuación se basan en optimizar la presentación antigénica de la vacuna, utilizando para ello herramientas previamente desarrolladas en nuestro laboratorio para potenciar la protección tanto frente a patógenos virales (Rodriguez et al., 1998; Rodriguez et al., 2001; Rodriguez and Whitton, 2000; Rodriguez et al., 1997), como para romper la tolerancia contra antígenos propios tumorales y conferir protección frente al melanoma en ratones (Xiang et al., 2000).

Así pues, con el objetivo de mejorar los resultados obtenidos con pCMV-PrPm, se desarrollaron dos nuevos plásmidos:

- i) pCMV-UbPrPm, vacuna de ADN que expresa la proteína del prión murina fusionada a un monómero de ubiquitina que marca la proteína para ser degradada en el proteasoma, favoreciendo así su entrada en la ruta de presentación antigénica de clase I y potenciar en lo posible la respuesta T-CD8<sup>+</sup> citotóxica o “CTL” (Figura 23).
- ii) pCMV-PrPmLII, vacuna de ADN que expresa la proteína del prión murina fusionada a la señal de transporte al lisosoma de la proteína integral de membrana lisosomal de tipo II (LIMPII), con el objetivo de favorecer la entrada de antígeno en la ruta de presentación antigénica de clase II y potenciar en lo posible la respuesta T-CD4<sup>+</sup> cooperadora (Figura 23).





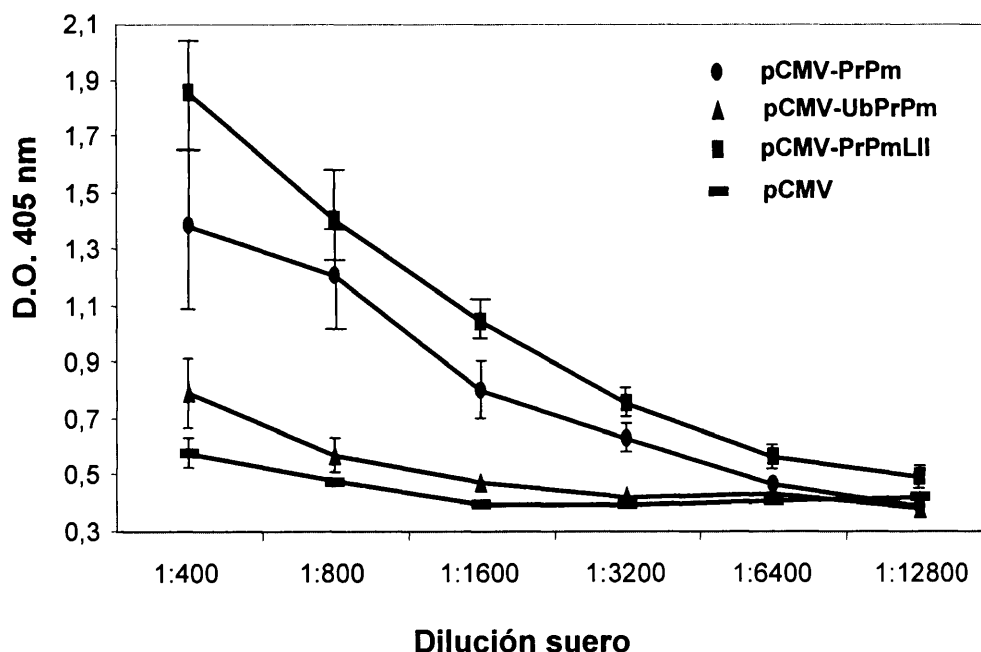
**Figura 23:** La fusión de un monómero de ubiquitina a la molécula del prión favorece su presentación antigénica por clase I, mientras que la fusión de LII a la molécula del prión favorece su presentación antigénica por clase II.

El tercer plásmido utilizado como vacuna fue pCMV-PrPm expresando la proteína del ratón tal cual, plásmido que en los estudios preliminares no había resultado efectivo a la hora de inducir una respuesta inmunológica en ratones normales. Finalmente el plásmido vacío pCMV fue utilizado como control negativo en los experimentos de inmunización.

#### **4.4.1. Respuesta humoral o de anticuerpos frente al prión murino tras la vacunación con ADN**

En primer lugar y con el fin de poder evaluar el potencial inmunogénico de las vacunas diseñadas evitando el problema de la tolerancia, éstas fueron testadas en ratones 129/Ola deficientes en la expresión de PrP<sup>C</sup> (Manson et al., 1994) o ratones PrPKO. Se vacunaron 4 ratones PrPKO con cada uno de los plásmidos: pCMV, pCMV-PrPm, pCMV-UbPrPm y pCMV-PrPmLII, para 6 semanas tras la última dosis, sangrar

todos los animales. En la figura 24 se representan los resultados de serología obtenidos utilizando un ELISA específico frente a PrP recombinante murina.

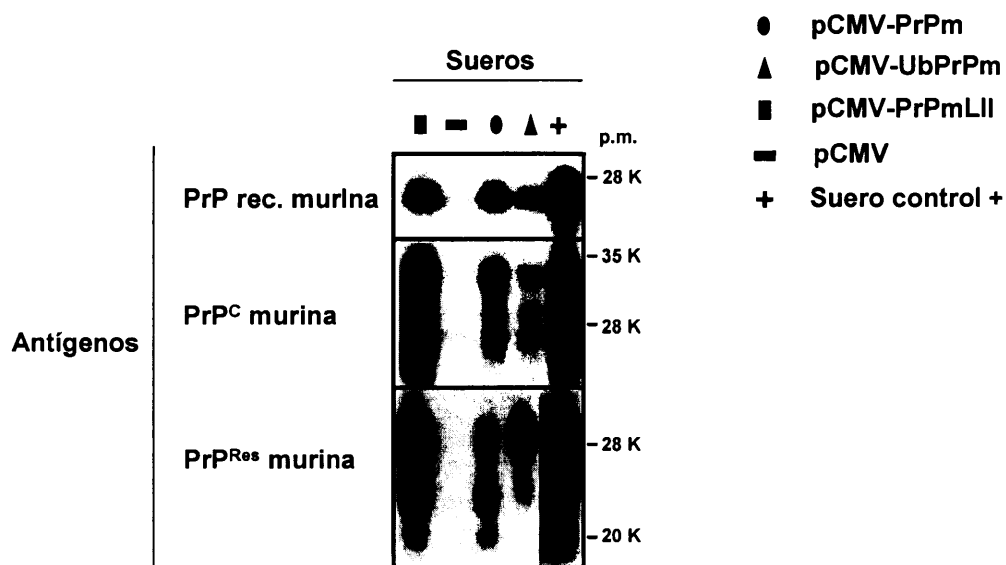


**Figura 24** Diluciones seriadas de sueros de ratones PrPKO inmunizados 3 veces con pCMV-PrPm (círculos), pCMV-UbPrPm (triángulos), pCMV-PrPmLII (cuadrados) y pCMV (rectángulos), fueron testados mediante la técnica de ELISA en placas tapizadas con PrP recombinante murina. Las barras representan las desviaciones estándar encontradas para cada grupo.

Como cabía esperar utilizando ratones PrPKO (Krasemann et al., 1996), todos los ratones inmunizados con pCMV-PrPm fueron capaces de generar una respuesta detectable y específica frente a la proteína PrP recombinante murina (círculos). En contraposición, ninguno de los animales vacunados con pCMV-UbPrPm (triángulos) parecía responder, observándose valores de D.O. prácticamente indistinguibles a los de los controles negativos pCMV (rectángulos). Finalmente, todos los animales inmunizados con la construcción pCMV-PrPmLII fueron capaces de generar una respuesta humoral específica y detectable llegando incluso a detectarse señal específica en el ELISA a una dilución de suero de 1:12800 (cuadrados). Cabe destacar además que los valores de D.O. obtenidos a cada una de las diluciones testadas en este grupo fueron siempre superiores que para el resto de los grupos de inmunización.

Con el fin de confirmar y extender estos resultados, se realizó un Western Blot (Figura 25) utilizando los mismos sueros anteriormente testados mediante el ELISA, a una dilución de 1:3200. En este caso, los sueros se enfrentaron a tres antígenos

diferentes, para poder evaluar su especificidad más al detalle: PrP recombinante murina (la misma utilizada en el ELISA), PrP<sup>C</sup> o proteína de prión normal procedente de extractos de cerebro de un ratón sin infectar y PrP<sup>res</sup> o proteína priónica infecciosa, procedente de extractos de cerebro de un ratón infectado con prión infeccioso tras el tratamiento con PK.



**Figura 25:** Western Blot utilizando sueros de animales inmunizados con pCMV-PrPm (círculo), pCMV-UbPrPm (triángulo), pCMV-PrPmLII (cuadrado) y pCMV (rectángulo) a una dilución 1:3200. Como control positivo fue utilizado un suero hiperinmune de ratón a dilución 1:2000 obtenido de un ratón PrPKO inmunizado con PrP recombinante murina junto a adyuvante de Freund. Los antígenos utilizados corresponden a: PrP recombinante murina, PrP<sup>C</sup> (extracto de cerebro de ratón 129P2/OlaHsd) y PrP<sup>res</sup> (extracto de cerebro de ratones infectados con priones tras tratamiento con proteinasa K).

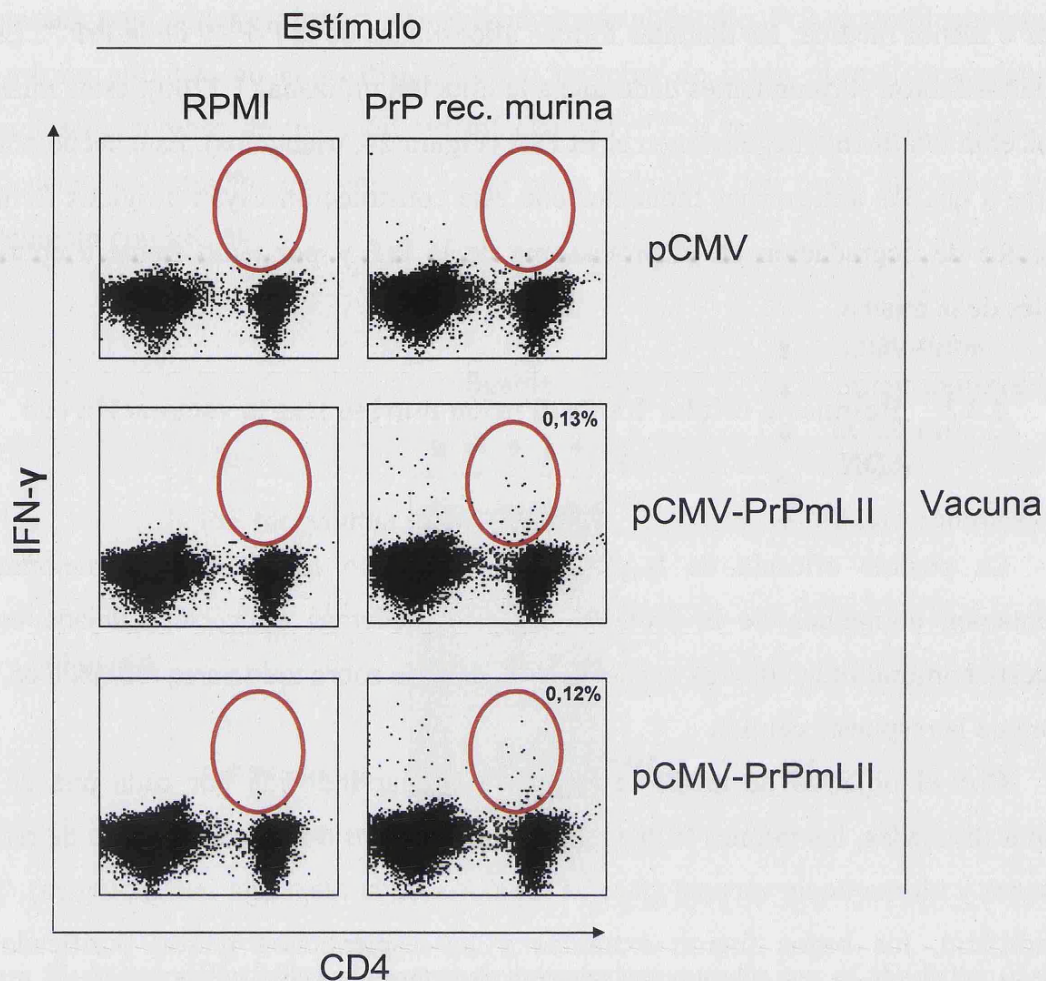
Los sueros de los animales inmunizados con pCMV-PrPm reconocen, como era de esperar, la proteína recombinante murina y en mayor o menor grado las tres formas características de la proteína priónica (no glicosilada, monoglicosilada y biglicosilada), tanto de la proteína celular (PrP<sup>C</sup>) como de la proteína infecciosa (PrP<sup>res</sup>). Los sueros obtenidos en los animales inmunizados con la construcción pCMV-PrPmLII destacan por ser capaces de reconocer muy intensamente tanto la proteína recombinante murina como las tres formas características de la PrP<sup>C</sup> y de la PrP<sup>res</sup>. Finalmente y de manera inesperada, los sueros de los animales inmunizados con la construcción pCMV-UbPrPm, fueron capaces de reconocer tanto la proteína recombinante murina como en

mayor o menor medida, las distintas formas glicosiladas de la PrP<sup>C</sup> y de la PrP<sup>res</sup>. Estos resultados fueron sorprendentes dado que a la dilución utilizada (1:3200), estos mismos sueros eran totalmente negativos en el ELISA (Figura 24, triángulos). Este hecho podría deberse a que los anticuerpos inducidos con esta construcción vayan dirigidos frente a productos de degradación en el proteasoma de la PrP y por tanto frente a epítomos lineales de la misma.

#### **4.4.2. Respuesta celular frente al prión murino tras la vacunación con ADN**

La posible eficacia de la fusión de señales o moléculas que mejoran la presentación antigénica de la proteína del prión, además de verse reflejada en la respuesta humoral inducida tras la vacunación, debería sobre todo verse reflejada en una mejora de la respuesta celular.

Con el objetivo de medir la respuesta celular inducida por cada una de las vacunas diseñadas, los ratones PrPKO fueron sacrificados 6 semanas después de recibir la tercera y última dosis vacunal (fase de memoria de la respuesta inmunológica). Tras el sacrificio, los bazo fueron extraídos y los esplenocitos fueron purificados e incubados durante 36 horas en presencia o ausencia del estímulo específico, en este caso proteína del prión murino semipurificada tras su expresión en *E.coli* (el mismo antígeno utilizado en el ELISA), para finalmente evaluar la respuesta celular inducida mediante la detección de IFN- $\gamma$  empleando la técnica del ICCS (ver materiales y métodos) (Figura 26). Como control negativo del ensayo se utilizó una proteína irrelevante semipurificada en las mismas condiciones.



**Figura 26:** Porcentaje de células TCD4<sup>+</sup> que expresan IFN- $\gamma$  en respuesta al estímulo específico (círculos) tras tres inmunizaciones con pCMV (2 paneles superiores) o con pCMV-PrPmLII (4 paneles inferiores) en ratones PrPKO.

Como cabía esperar, los esplenocitos de los animales vacunados con pCMV, no fueron capaces de estimular la expresión de IFN- $\gamma$ , independientemente del estímulo empleado (Figura 26, paneles superiores).

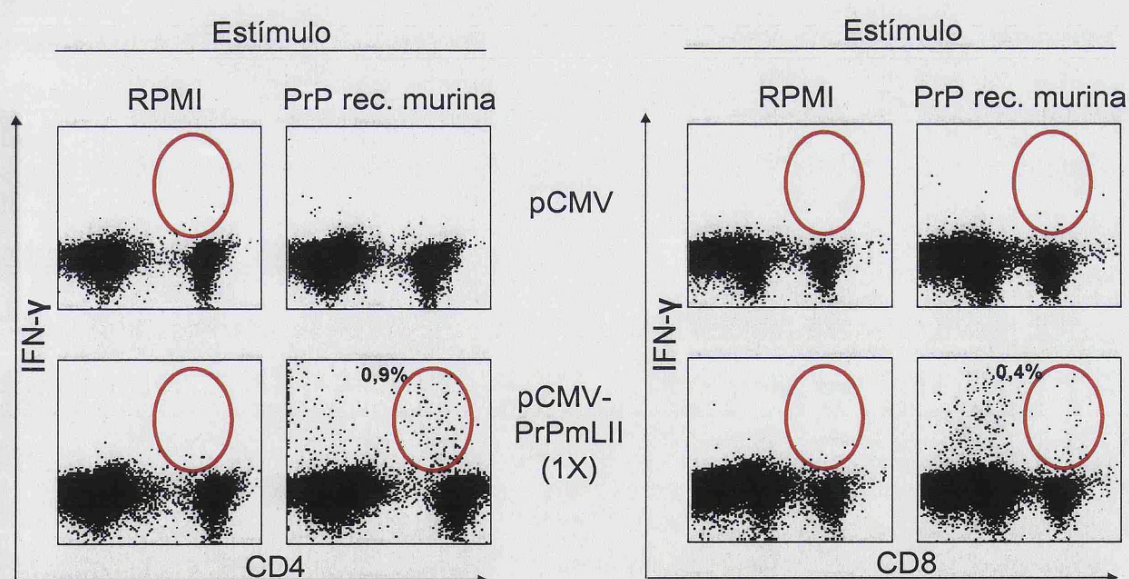
Al contrario de lo esperado dada la potente respuesta de anticuerpos inducida, ninguno de los ratones PrPKO inmunizados con pCMV-PrPm o con pCMV-UbPrPm fueron capaces de generar una respuesta celular T-CD4<sup>+</sup> detectable (datos no mostrados). En contraposición, todos los ratones PrPKO inmunizados con la construcción pCMV-PrPmLII generaron una potente respuesta celular T-CD4<sup>+</sup> específica contra el prión, siendo más del 0,1% de las células T-CD4<sup>+</sup> del animal, capaces de responder al estímulo, expresando IFN- $\gamma$  (marcadas con una elipse en el cuadrante superior derecho de cada uno de los paneles de la figura 26). Así pues, la



vacuna pCMV-PrPmLII no sólo potencia la respuesta humoral, sino también la respuesta T-CD4<sup>+</sup> o “cooperadora”.

Para estudiar con mayor detalle la inmunogenicidad de la vacuna pCMV-PrPmLII, ratones PrPKO fueron inmunizados con una sola dosis, bien con esta construcción, o bien con el control negativo pCMV. Seis semanas tras la inyección, los animales se sacrificaron previo sangrado para medir la respuesta de anticuerpos específica inducida. Como cabía esperar, tras una única dosis vacunal con pCMV-PrPmLII, la respuesta de anticuerpos inducida fue indetectable (datos no mostrados). En contraposición, la respuesta celular T-CD4<sup>+</sup> inducida resultó ser muy potente (Figura 27), incluso mayor que la observada tras tres dosis de vacuna en los mismos ratones PrPKO (comparar los porcentajes de células doble positivas para CD4<sup>+</sup> e IFN- $\gamma$  representados en las figuras 26 y 27).

La respuesta celular inducida por una sola dosis vacunal con el plásmido pCMV-PrPmLII en ratones PrPKO fue tan eficiente que no sólo se detectaban células T-CD4<sup>+</sup> sino también células T-CD8<sup>+</sup> (sección derecha de la figura 27)



**Figura 27:** Porcentaje de células T-CD4<sup>+</sup> (4 paneles izquierda) y T-CD8<sup>+</sup> (4 paneles derecha) que expresan IFN- $\gamma$  en respuesta al estímulo específico (círculos), tras una inmunización con pCMV (4 paneles superiores) o con pCMV-PrPmLII (4 paneles inferiores) en ratones PrPKO.

En resumen, la vacunación de ratones PrPKO con pCMV-PrPmLII (expresando el prión fusionado a una señal de direccionamiento al lisosoma), potencia la respuesta T-CD4<sup>+</sup> específica que a su vez, actúa muy probablemente como cooperadora (“cooperadora”) potenciando tanto la respuesta celular T-CD8<sup>+</sup> (citotóxica) como la respuesta humoral (de anticuerpos). El resto de las vacunas, incluyendo pCMV-UbPrPm, aunque son capaces de inducir una respuesta de anticuerpos específica en ratones PrPKO, no son capaces de estimular respuestas celulares detectables con los métodos aquí utilizados.

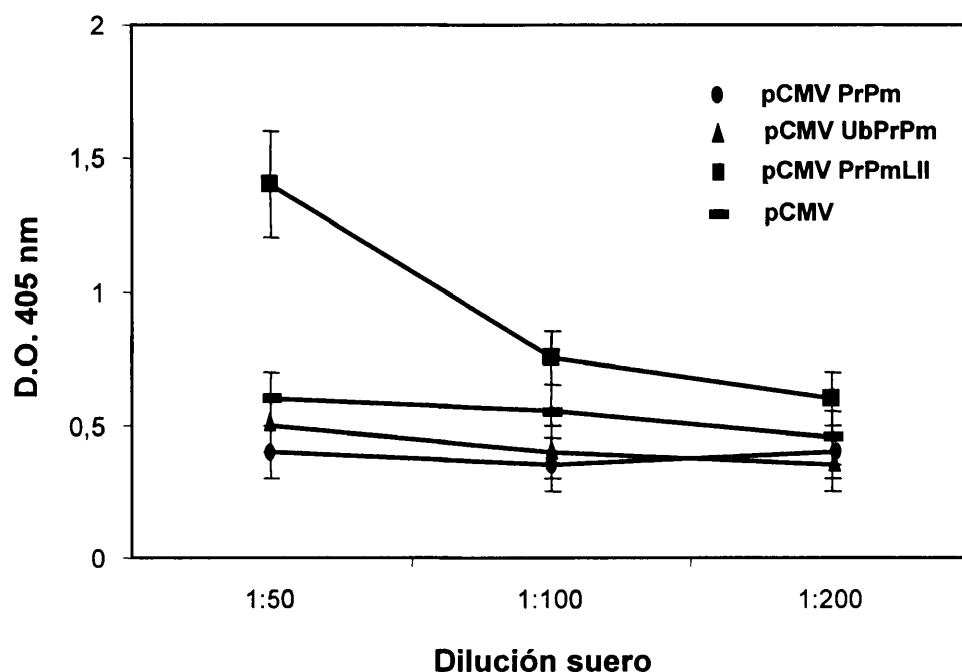
#### **4.4.3. Estudios de protección frente al desafío con el prión infeccioso tras la vacunación con ADN expresando el prión murino.**

Una vez estudiado el potencial inmunogénico de cada una de las construcciones generadas en los ratones PrPKO, en que no se hace necesario romper la barrera de la tolerancia, el siguiente paso consistió en inmunizar ratones 129P2/OlaHsd normales, y por tanto, que expresan niveles fisiológicos de PrP<sup>C</sup>. Así pues en esta ocasión, se inmunizaron ratones normales con tres dosis de cada uno de los plásmidos diseñados: pCMV-PrPm, pCMV-UbPrPm y pCMV-PrPmLII, incluyendo además el grupo control negativo inmunizado con pCMV.

##### 4.4.3.1. Respuesta humoral inducida en ratones normales tras la vacunación con ADN expresando diversas formas del prión murino

Seis semanas tras la última dosis vacunal, los animales fueron sangrados y sus sueros utilizados para detectar anticuerpos específicos mediante la técnica de ELISA tapizando las placas con proteína recombinante murina (Figura 28). Como ya había sido descrito al principio en esta misma sección, la vacunación de ratones normales con pCMV-PrPm no fue capaz de superar la tolerancia e inducir una respuesta de anticuerpos contra el prión (Figura 12 A). En este caso, únicamente los ratones normales vacunados con pCMV-PrPmLII fueron capaces de inducir una respuesta específica de anticuerpos, capaces de reconocer la proteína recombinante mediante un ELISA (Figura 28). Como era de esperar, a pesar de que la vacuna pCMV-PrPmLII fuera capaz de romper la tolerancia frente al prión en ratones normales, la respuesta

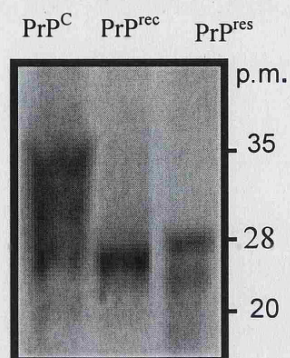
obtenida resultó inferior a la conseguida en ratones PrPKO (comparar títulos de ELISA figuras 24 y 28).



**Figura 28:** Diluciones seriadas del suero extraído 6 semanas tras la tercera y última inmunización de ratones normales inmunizados con pCMV-PrPm (círculos), pCMV UbPrPm (triángulos), pCMV PrPmLII (cuadrados) y pCMV (rectángulos), fueron testados mediante la técnica de ELISA en placas tapizadas con PrP recombinante murina. Las barras representan las desviaciones estándar observadas entre animales dentro del mismo grupo

Los resultados del Western Blot utilizando estos mismos sueros a una dilución 1:200 confirmaron los obtenidos en el ELISA. Así, ninguno de los animales inmunizados con pCMV-PrPm o con pCMV-UbPrPm, fue capaz de generar una respuesta detectable de anticuerpos (resultados no mostrados), en contraposición a lo observado tras la vacunación de ratones PrPKO (Figura 25). De nuevo, únicamente los sueros de los animales inmunizados con pCMV-PrPmLII, demostraron ser específicos siendo capaces de reconocer tanto al proteína recombinante como las diversas formas glicosiladas del prión celular normal ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ) e infeccioso ( $\text{PrP}^{\text{res}}$ ) en un Western blot (Figura 29).





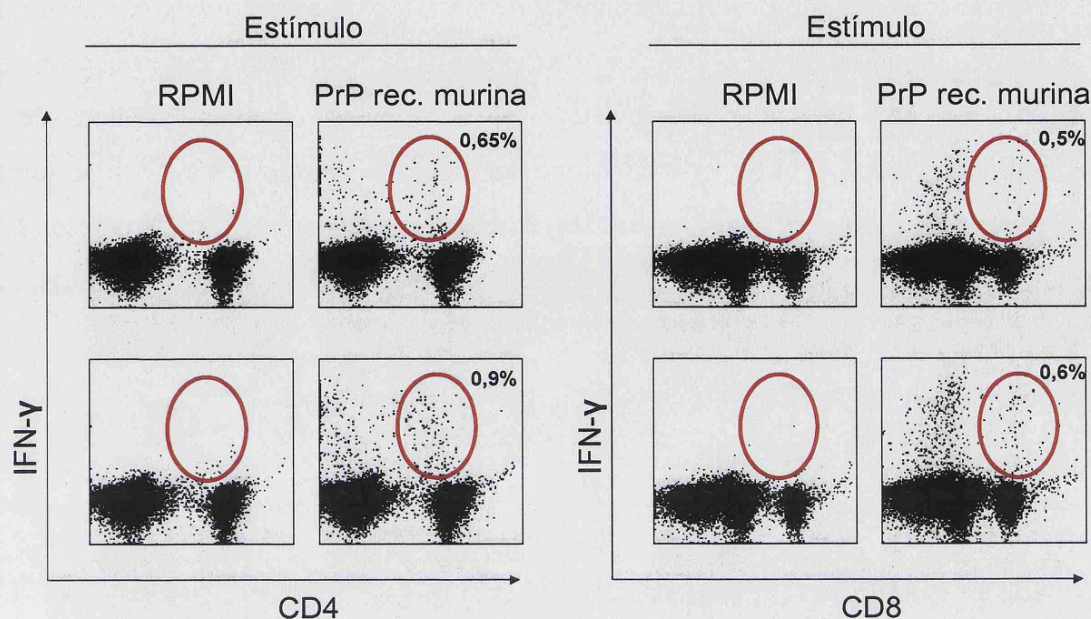
**Figura 29:** Western Blot utilizando un suero representativo de un ratón inmunizado con pCMV-PrPmLII, a una dilución 1:200. Los antígenos utilizados en el WB corresponden con: PrP<sup>C</sup> (extracto de cerebro de ratón 129/ola), PrP recombinante murina y PrP<sup>res</sup> (extracto de cerebro de ratones infectados con priones tras el tratamiento con proteinasa K).

#### 4.4.3.2. Respuesta celular inducida en ratones normales tras la vacunación con ADN expresando diversas formas del prión murino

Con el fin de estudiar los efectos de nuestras vacunas en ratones normales a nivel de respuesta celular, los ratones fueron sacrificados 6 semanas tras la última inmunización. Tras la extracción del bazo y posterior purificación de los esplenocitos, éstos fueron incubados durante 36 horas en ausencia y en presencia de la proteína recombinante murina. Finalmente, la respuesta celular (T-CD4<sup>+</sup> y T-CD8<sup>+</sup>) específicamente inducida contra el prión, se midió utilizando la técnica del ICCS que permite medir específicamente el número de células T que específicamente expresan IFN- $\gamma$  en respuesta al estímulo específico (Figura 30).

Coincidiendo con los resultados obtenidos de la serología (Figuras 28 y 29), la vacunación con pCMV-PrPmLII resultó muy eficiente a la hora de inducir tanto una respuesta T-CD4<sup>+</sup> como T-CD8<sup>+</sup> (panel izquierdo y derecho respectivamente en figura 30) específica contra el prión. De nuevo, la inmunización de ratones normales con pCMV-PrPm y pCMV-UbPrPm rindió resultados indistinguibles de los obtenidos con pCMV (control negativo), no pudiendo detectarse estimulación específica alguna.





**Figura 30:** Porcentaje de células T-CD4<sup>+</sup> (4 paneles izquierda) y T-CD8<sup>+</sup> (4 paneles derecha) que expresan IFN- $\gamma$  en respuesta al estímulo específico (círculos) tras tres inmunizaciones con pCMV-PrPmLII. Los resultados mostrados corresponden a dos ratones inmunizados con este plásmido.

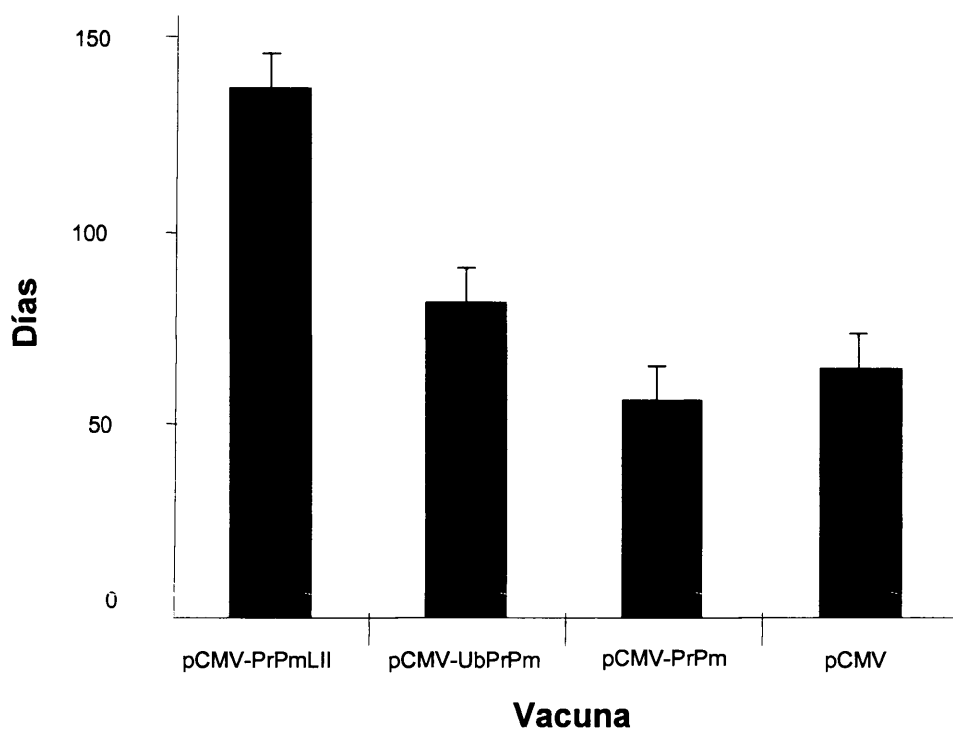
Como conclusión a todos estos estudios podemos afirmar que la vacunación de ratones normales con una vacuna ADN que expresa la proteína del prión de ratón fusionada a la secuencia señal de transporte a los lisosomas de LIMPII, permite romper la tolerancia y potenciar la inducción de una respuesta inmunológica humoral y celular (ambas de células T-CD8<sup>+</sup> como T-CD4<sup>+</sup>) contra el prión.

#### 4.4.3.3. Estudios de protección frente al desafío con el prión infeccioso tras la vacunación con ADN expresando el prión murino

Como ha sido descrito en la introducción, para que la infección por priones progrese, resulta esencial la presencia del prión celular endógeno (PrP<sup>C</sup>), que actúa como molde para producir nuevo prión infeccioso (PrP<sup>Sc</sup>). Así pues, debido a que los ratones PrPKO no son susceptibles a la infección, decidimos evaluar la capacidad protectora de nuestras vacunas en ratones normales.

Cuatro ratones normales fueron inmunizados por grupo usando con los siguientes plásmidos: pCMV-PrPm, pCMV-UbPrPm y pCMV-PrPmLII, utilizando de nuevo pCMV como control. 6 semanas tras recibir la última dosis vacunal, todos los animales fueron desafiados intracranealmente utilizando una dosis letal de material

infeccioso adaptado a ratón (ver materiales y métodos), para a continuación realizar un seguimiento semanal “a ciegas” (sin que el observador pudiera identificar cada grupo de inmunización), para controlar la aparición de los primeros síntomas clínicos de la enfermedad (Figura 31), el periodo en el que los animales comienzan a sufrir síntomas severos de la enfermedad (ver materiales y métodos) y finalmente la muerte. Los animales en estado terminal de la enfermedad fueron sacrificados por razones éticas.



**Figura 31:** Ratones normales fueron inmunizados con pCMV-PrPmLII, pCMV-UbPrPm, pCMV-PrPm y pCMV (4 por grupo). Seis semanas tras la última inmunización, todos los animales fueron infectados intracranealmente con una dosis letal de prión infeccioso. Los bloques sólidos indican el tiempo transcurrido desde la infección hasta la aparición de los primeros síntomas clínicos de la enfermedad. Las barras indican la desviación Standard encontrada para cada grupo.

El grupo control de ratones inmunizados con pCMV desarrolló signos clínicos aproximadamente a partir del día 65 post-infección (semana 10) mientras que los ratones inmunizados con pCMV-PrPm lo hicieron aproximadamente a partir del día 57 post-desafío (semana 9). Estos dos grupos de ratones (inmunizados con pCMV e inmunizados con pCMV-PrPm) murieron en la semana 20 post-desafío.

Los ratones inmunizados con pCMV-UbPrPm presentaron un retraso significativo ( $p < 0.001$ ) en la aparición de sintomatología clínica dado que no se manifestaron signos

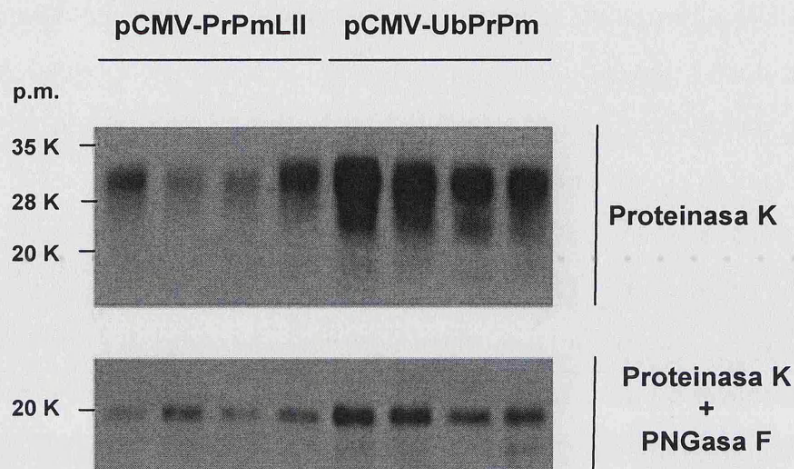
característicos de la enfermedad aproximadamente hasta el día 82 post-desafío (semana 12), con más de dos semanas de retraso respecto a los controles vacunados con pCMV. Estos animales sucumbieron en la semana 22 post-infección tras un periodo de dos semanas manifestando signos clínicos muy severos.

Mucho más sorprendentes fueron los resultados obtenidos con los ratones inmunizados con pCMV-PrPmLII, los cuales presentaron un retraso muy significativo en la aparición de la sintomatología clínica respecto al grupo control pCMV. Estos animales manifestaron los primeros signos característicos de la enfermedad a partir del día 138 post-infección (semana 20), lo cual supone un retraso de más del doble respecto a los animales control. Además, en ningún momento se observaron signos severos de la enfermedad, a pesar de lo cual sucumbieron en la semana 22 post-desafío.

En conclusión, la vacuna pCMV-PrPmLII no sólo fue capaz de romper la tolerancia en ratones normales, potenciando la respuesta humoral y celular, sino que además permitió que tras el desafío intracraneal con el prión infeccioso, los animales vivieran más del doble de lo normal sin sintomatología clínica de la enfermedad detectable. A pesar de no desarrollar apenas síntomas, los animales acabaron sucumbiendo únicamente con un retraso de 2 semanas respecto a los controles.

A pesar de que a día de hoy no existen evidencias concluyentes de ello, muchos autores asumen que existe una clara correlación entre el acumulo de PrP<sup>Sc</sup> y el desarrollo de la enfermedad (Beringue et al., 2004; Peretz et al., 2001; Perrier et al., 2004; White et al., 2003). Así pues, para comprobar si existía alguna correlación entre protección y una reducción en el acumulo de PrP<sup>res</sup>, se realizó un Western Blot *post-mortem* a partir del encéfalo de ratones vacunados con pCMV-PrPmLII y pCMV-UbPrPm, sacrificados todos en la semana 22 tras el desafío. Tras el tratamiento con proteinasa K de los extractos cerebrales, se pudo observar una clara reducción en los niveles de acumulación de PrP<sup>res</sup> en cada uno de los ratones vacunados con pCMV-PrPmLII, cuando se comparaban con los ratones vacunados con pCMV-UbPrPm, a pesar de que todos los ratones habían muerto prácticamente a la vez (Figura 32). Estos resultados se confirmaron tras realizar un Western Blot de muestras tratadas con PNGasa F, tratamiento que elimina los azúcares asociados a la proteína produciendo la migración simultánea de todas las formas glicosiladas de la proteína en una única banda que corresponde con la forma no glicosilada del prión (panel inferior de la figura 32).





**Figura 32:** Western Blot de las muestras de encéfalo de ratones inmunizados con pCMV-PrPmLII y pCMV-UbPrPm utilizando el anticuerpo 2A11 a una dilución 1:3000. El panel superior corresponde al tratamiento de las muestras con proteinasa K y el inferior al tratamiento de las mismas con proteinasa K y PNGasa F.

Resumiendo todos estos resultados, la vacunación con pCMV-PrPmLII fue capaz de romper la tolerancia y de inducir una respuesta inmunológica muy completa que cubre la inducción tanto de anticuerpos específicos contra el prión, como una respuesta específica de células T-CD8<sup>+</sup> y de células T-CD4<sup>+</sup> capaces de retrasar ostensiblemente la manifestación de signos clínicos específicos y por tanto, el desarrollo normal de la patología priónica, tras el desafío intracraneal.

## 5. DISCUSIÓN

*Ciencia es aquello sobre lo cual cabe siempre discusión*

Jose Ortega y Gasset



Como ya ha sido comentado a lo largo de la introducción de esta tesis, las encefalopatías espongiformes transmisibles (EETs) engloban a un grupo de enfermedades con orígenes muy dispares. Desde las más conocidas debido a su gran repercusión mediática como el llamado “mal de las vacas locas”; cuya etiología es de tipo infeccioso, pasando por formas esporádicas de la enfermedad, hasta las encefalopatías con un origen genético, que suponen más del 15% de las EETs en humanos (Collinge, 2001; Wadsworth et al., 2003). Estas últimas se caracterizan por la presencia en el genoma del individuo de una variante del gen del prión que o bien contiene una mutación puntual o bien una inserción repetida de nucleótidos, dando lugar en ambos casos a una proteína cuyo plegamiento es anómalo y que resulta patogénica a largo plazo para el organismo. Dependiendo de la mutación contenida en la PrP<sup>C</sup> del individuo, tanto el curso como la sintomatología de la enfermedad variarán ostensiblemente. Así por ejemplo, las mutaciones de PrP<sup>C</sup> humana en las que hemos centrado este trabajo: E200K, D178N y A117V, se asocian los fenotipos CJD familiar, Insomnio Familiar Fatal y Gerstmann-Sträussler-Scheinker, respectivamente, enfermedades fatales para las que actualmente no existe un tratamiento eficaz.

Entre los posibles tratamientos y métodos terapéuticos contra las EETs, la inmunoterapia ha comenzado a dar sus primeros frutos (Chesebro, 2002; Donofrio et al., 2005; Heppner et al., 2001b; Nikles et al., 2005; Polymenidou et al., 2004; Rosset et al., 2004; Schwarz et al., 2003; Sigurdsson et al., 2002) al menos experimentalmente.

A pesar de que el agente causal de la enfermedad es un antígeno propio frente al cual no se produce una respuesta inmunológica detectable durante el transcurso de la enfermedad (Aucouturier and Carnaud, 2002; Aucouturier et al., 2000; Berg, 1994; Heppner and Aguzzi, 2004; Porter et al., 1973; Williamson et al., 1996), decidimos explorar los efectos que la estimulación específica del sistema inmunológico contra el prión pudiera tener en el tratamiento y/o prevención de las EETs. La experiencia obtenida en los últimos años en el diseño de vacunas contra el cáncer (Antony et al., 2005; Jiao et al., 2006; Yu and Restifo, 2002) o el Alzheimer (Ingram, 2001; Janus et al., 2000; Morgan et al., 2000), inmunizando con antígenos propios, avalaban el realizar este esfuerzo.

Al iniciar este trabajo tuvimos que hacer frente a dos serios inconvenientes: Por un lado, existía una carencia casi total de conocimientos sobre la antigenicidad e inmunogenicidad de la/s molécula/s del prión y menos aún sobre la existencia de epítomos concretos que permitieran estudiar éstas de una manera sencilla y eficaz. Por



otro lado, el hecho de que la proteína del prión fuera un antígeno propio hacía doblemente difícil el poder desarrollar estrategias inmunoterapéuticas y/o vacunales capaces de romper la barrera de la tolerancia. Así pues, con el objetivo de abordar ambos problemas decidimos, en primer lugar, utilizar la inmunización con ADN como herramienta metodológica para comparar *in vivo* la respuesta inmunológica inducida por diversas variantes del prión humano (normal y conteniendo mutaciones “patogénicas”) y posteriormente, combinar esta herramienta de vacunación con una serie de estrategias previamente desarrolladas en nuestro laboratorio (Leifert et al., 2004; Rodriguez and Whitton, 2000) con el objetivo de potenciar la presentación antigénica de la vacuna y romper la tolerancia frente al prión utilizando un modelo de ratón.

### **5.1. La presentación antigénica de la PrP<sup>C</sup> humana y de sus variantes patogénicas es distinta: implicaciones en la respuesta inmunológica inducida en ratón tras la vacunación con ADN.**

Como cabía esperar debido a los fenómenos de tolerancia, ningún ratón inmunizado con un plásmido expresando la proteína del prión murina fue capaz de generar una respuesta de anticuerpos. Sin embargo el simple cambio de 25 aminoácidos en la proteína, diferencia que existe entre el prión humano y el ratón (Figura 33), permiten su reconocimiento como “extraño”, provocando que el 38% de los ratones inmunizados con pCMV-PrPh respondieran, induciendo anticuerpos capaces de reconocer tanto las formas nativas del prión humano como la del ratón.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
PrPh	M	A	N	L	G		W		L		L	F	V		W		D		G	L	C	K	K	R	P	K	P	G	G	W	N	T	G	G	S	R	
PrPm	M	A	N	L	G		W		L		L	F	V		W		D		G	L	C	K	K	R	P	K	P	G	G	W	N	T	G	G	S	R	
	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74
PrPh	Y	P	G	Q	G	S	P	G	G	N	R	Y	P	P	Q	G	G		W	G	Q	P	H	G	G	G	W	G	Q	P	H	G	G		W	G	
PrPm	Y	P	G	Q	G	S	P	G	G	N	R	Y	P	P	Q	G	G		W	G	Q	P	H	G	G	G	W	G	Q	P	H	G	G		W	G	
	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111
PrPh	Q	P		G	G	G	W	G	Q	P	H	G	G	G	W	G	Q	G	G	G	T	H		Q	W	N	K	P	S	K	P	K	T	N		K	H
PrPm	Q	P		G	G	G	W	G	Q	P	H	G	G	G	W	G	Q	G	G	G	T	H		Q	W	N	K	P	S	K	P	K	T	N		K	H
	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148
PrPh		A	G	A	A	A	A	G	A	V	V	G	L	G	G	Y	M	L	G	S	A	M	S	R	P	I	I	H	F	G	S	D	Y	E	D	R	
PrPm		A	G	A	A	A	A	G	A	V	V	G	L	G	G	Y	M	L	G	S	A	M	S	R	P	I	I	H	F	G	S	D	Y	E	D	R	
	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185
PrPh	Y	Y	R	E	N	M		R	Y	P	N	Q	V	Y	Y	R	P		D		Y	S	N	Q	N	N	F	V	H	D	C	V	N	I	T	I	K
PrPm	Y	Y	R	E	N	M		R	Y	P	N	Q	V	Y	Y	R	P		D		Y	S	N	Q	N	N	F	V	H	D	C	V	N	I	T	I	K
	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222
PrPh	Q	H	T	V	T	T	T	T	K	G	E	N	F	T	E	T	D	V	K	M	M	E	R	V	V	E	Q	M	C		T	Q	Y		E	S	
PrPm	Q	H	T	V	T	T	T	T	K	G	E	N	F	T	E	T	D	V	K	M	M	E	R	V	V	E	Q	M	C		T	Q	Y		E	S	
	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253						
PrPh	Q	A	Y	Y		R		S	S		V	L	F	S	S	P	P	V	I	L	L	I	S	F	L	I	F	L	I	V	G						
PrPm	Q	A	Y	Y		R		S	S		V	L	F	S	S	P	P	V	I	L	L	I	S	F	L	I	F	L	I	V	G						

**Figura 33: Secuencia de aminoácidos de la proteína PrP humana (PrPh) y PrP murina (PrPm). Las diferencias entre ambas se han señalado con un cuadrado. Datos obtenidos de la base de datos EMBL.**

El hecho de que determinadas mutaciones puntuales en esta secuencia (D178N, E200K o A117V), abolieran prácticamente al 100% la capacidad de la vacuna para inducir este tipo de anticuerpos, permite asegurar que ésta no depende de diferencias lineales en la secuencia de aminoácidos de la proteína, sino más bien ha de deberse a propiedades tales como son su localización intracelular y/o a los mecanismos de degradación que utilicen las proteínas en estudio. De acuerdo con esta teoría, se ha podido demostrar que cada una de las mutaciones “patogénicas” en la molécula del prión, bloquea parcial o totalmente su transporte natural a la membrana extracelular, quedando atrapadas en compartimentos intracelulares (Capellari et al., 2000; Jin et al., 2000; Negro et al., 2001; Petersen et al., 1996; Singh et al., 1997; Zanusso et al., 1999). Del mismo modo se ha descrito que en general, las formas mutadas de la PrPh poseen una vida media inferior a la forma no mutada debido a su inmediata degradación intracelular tras su síntesis (Wickner et al., 1999). El bloqueo del transporte de las formas mutadas de la proteína del prión a la membrana extracelular como su procesamiento y degradación intracelular pueden ser más o menos efectivos dependiendo en gran medida del tipo de mutación que contenga así como de sus niveles de expresión. Así mientras que el PrPh normal se localiza en superficie celular, las proteínas mutadas endógenas A117V, D178N, E200K no se encuentran nunca en superficie (Capellari et al., 2000; Negro et al., 2001; Petersen et al., 1996). Tras la sobreexpresión artificial sin embargo, algunas moléculas de E200K son capaces de

alcanzar a la superficie celular, mientras que la variante A177V nunca se observa en la membrana extracelular (Ivanova et al., 2001), lo que podría explicar las diferencias observadas tras la vacunación con ADN y las distintas variantes del prión humano (Figura 16). Mientras que 1/8 de los ratones vacunados con E200K induce una respuesta de anticuerpos que reconoce el prión nativo, reflejo más que probable del “escape” *in vivo* de la proteína a la superficie de la célula presentadora de antígeno, la vacunación con A117V nunca provocó una respuesta de anticuerpos específica.

El prión normal es una proteína de membrana que posee por tanto, un péptido señal que, como hemos visto en la sección 4.2 de resultados, resulta muy eficiente para transportar epítomos B del VFA a la superficie celular, permitiendo su interacción con las células B y la inducción de anticuerpos neutralizantes protectivos tanto en ratón como en el cerdo, huésped natural de este virus. En el caso de que la proteína a ser secretada o transportada a la superficie celular no pase el “control de calidad” en el retículo endoplasmático, por ejemplo por poseer un plegamiento anómalo, caso de las variantes mutadas del prión (mutadas), quedarían retenidas para prevenir su salida a la membrana plasmática (Ellgaard et al., 1999; Hurlley and Helenius, 1989). En general, estas proteínas quedan marcadas para su rápida degradación, normalmente en el proteasoma (Bonifacino and Weissman, 1998), lo que ayudaría a explicar el hecho de que tras la vacunación con ADN expresando las variantes E200K y D178N (nunca con A117V), se indujeran anticuerpos capaces de reconocer únicamente al prión en su forma desnaturalizada (Figura 17). Así, mientras que en la vacunación con ADN codificante del gen de PrP<sup>C</sup> humano la proteína se expresaría en forma nativa en la superficie de la células, lo único que llegaría a interactuar con las células B tras la vacunación con D178N y E200K podrían ser productos de degradación intracelular (polipéptidos y péptidos) dando lugar a anticuerpos capaces de reconocer estos mismos epítomos lineales del prión.

Otra posible explicación vendría dada por el propio plegamiento anormal de la proteína que provocaría que en el caso de “escape” hacia la superficie celular, indujera únicamente anticuerpos capaces de reconocer formas mal plegadas del prión y nunca (o casi nunca) reconocerían la estructura terciaria nativa o correctamente plegada del prión. Esta última hipótesis podría ayudar a explicar el por qué A117V no es capaz de inducir ningún tipo de anticuerpos específicos. Mientras que D178N y E200K sufrirían algún escape ocasional, A117V quedaría permanentemente retenido intracelularmente dando

lugar únicamente a una respuesta celular, al menos en lo que se refiere a una potente respuesta de células T-CD8<sup>+</sup> citotóxicas (CTL).

Ante la ausencia de epítomos CTL (T-CD8<sup>+</sup>) descritos en la propia molécula del prión, para estudiar ésta, fue necesario recurrir a una “artimaña” molecular que consistió en construir moléculas quiméricas del prión conteniendo epítomos CTL del LCMV, virus modelo “ideal” para estudiar la respuesta CTL en ratón, ya que éstos son el único determinante involucrado en protección frente al virus. El disponer de las herramientas necesarias para poder estudiar a nivel celular tanto la respuesta inmunológica inducida contra epítomos perfectamente caracterizados del virus (péptidos individuales, tetrámeros...), como la protección conferida por vacunas que contienen éstos tras ser expresados en diversos vectores y contextos, ha demostrado ser de gran utilidad con anterioridad en multitud de ocasiones (Leifert et al., 2004; Rodriguez and Whitton, 2000; Whitton et al., 1993). Así pues, en esta ocasión decidimos comparar la respuesta CTL inducida contra un epítopo del LCMV y la protección conferida contra el virus, tras la vacunación con plásmidos que expresan bien la forma normal del prión humano o bien cada una de las variantes “patogénicas” descritas previamente (D178N, A117V o E200K) conteniendo todas ellas el epítopo GP<sub>33</sub> del LCMV. Como cabía esperar, los resultados de protección frente al LCMV coincidieron a la perfección con la inducción de una respuesta CTL muy potente contra el virus. De este modo, los únicos ratones capaces de reducir en más de un logaritmo y medio la carga de virus en bazo a día 4 tras la infección (Figura 19), disponían de al menos un 7% de células T-CD8<sup>+</sup> capaces de reconocer específicamente el péptido GP<sub>33</sub> contenido en la vacuna (Figura 18). Curiosamente, mientras que ninguno de los ratones vacunados con pCMV-PrPhET (expresando el prión humano normal junto con el epítopo GP<sub>33</sub>) llegó a quedar sólidamente protegido, el 50% de los ratones vacunados con pCMV-E200KET y pCMV-A117VET, así como el 75% de los vacunados con pCMV-D178NET sí fueron capaces de sobrevivir al desafío viral, con dos ratones pertenecientes a este último grupo permaneciendo totalmente libres de virus. Este resultado no es para nada desdeñable ya que utilizando este mismo epítopo y vacunas ADN no se han conseguido nunca estos niveles de protección (Rodriguez et al., 1998), lo que implica muy probablemente una degradación muy eficiente de D178NET en el proteasoma y la óptima presentación de GP<sub>33</sub> tras la vacunación con ADN. Sorprendentemente, los resultados de protección frente al LCMV tras la vacunación, son los inversos a los recién descritos para la inducción de la respuesta de anticuerpos: mientras que las formas mutadas resultan muy

eficientes a la hora de inducir una respuesta CTL, la presentación de la forma normal del prión parece favorecer principalmente la inducción específica de anticuerpos. De las demás vacunas utilizadas, sólo aquella conteniendo los ET junto con el péptido señal del prión resultó eficiente en el 25% de los casos (1 de 4 ratones vacunados), a la hora de inducir tanto una respuesta T como protección, resultado que encaja con la capacidad de éste de actuar como transportador no sólo de epítomos B sino también de epítomos T del VFA, ayudando a explicar la protección conferida frente al VFA incluso en ausencia de anticuerpos en el cerdo, huésped natural del virus (Figura 14).

De modo resumido podríamos concluir que, mientras que la proteína del prión humana sin mutar es capaz de ser presentada en la superficie celular tras la vacunación con ADN, favoreciendo la generación de anticuerpos, las distintas mutaciones “patogénicas” de la misma provocan su acumulación intracelular, facilitando su presentación antigénica por clase I y la inducción de una respuesta CTL. La falta de tiempo durante el desarrollo de esta tesis ha impedido que estos resultados hayan podido ser completados caracterizando la capacidad de las diversas variantes del prión para presentar epítomos T-CD4<sup>+</sup> que requieren ser procesados en distintos compartimentos intracelulares, también incluidos en ET (Rodríguez et al., 2001).

A nuestro juicio, de los resultados hasta aquí obtenidos podrían extraerse conclusiones útiles para el futuro. Por un lado, diferencias tan dramáticas en la presentación antigénica como las observadas entre el prión humano normal y sus variantes patogénicas, podrían quizás verse reflejadas en la inducción de respuestas CTL específicas contra el prión durante la progresión de la enfermedad, que a su vez podrían servir de marcador diagnóstico. Del mismo modo, si el tipo de plegamiento observado para las formas mutadas es similar para el prión infeccioso (PrP<sup>Sc</sup>), quizás estos resultados podrían ser extrapolables a las encefalopatías transmisibles infecciosas. ¿Por qué no utilizar una respuesta celular específica como un marcador de enfermedad en el futuro? El hecho recién demostrado de que diferencias en la conformación de PrP y PrP<sup>Sc</sup>, se ven reflejadas en el tipo de respuesta inmunológica que provocan, parece avalar esta propuesta (iKhalili-Shirazi et al., 2005). Por otro lado, aunque en relación con lo anteriormente expuesto, las lecciones aprendidas quizás permitan en un futuro diseñar estrategias inmunopreventivas específicamente dirigidas a inhibir la progresión de la enfermedad, bien estimulando un tipo de respuesta inmunológica u otra.

A pesar de la potente respuesta inmunológica que parece provocar la vacunación con las diversas variantes patogénicas del prión humano, en ningún caso se pudo observar protección frente al desafío intracraneal con un prión infeccioso adaptado a ratón. Este resultado va en contra de lo previamente publicado por Ishibashi y colaboradores, que demostraban protección “heteróloga” en ratones, vacunando con proteína recombinante bovina y ovina (Ishibashi et al., 2006). Las diferencias entre ambos resultados podrían deberse tanto al tipo de inóculo utilizado en cada trabajo como más probablemente a la ruta de inoculación utilizada, ya que en el citado trabajo el desafío con el prión infeccioso fue realizado siguiendo la ruta intraperitoneal. Al igual que sucede para la mayoría de las infecciones con patógenos clásicos (virus, bacterias), resulta lógico pensar que la protección conferida por una vacuna en concreto, esté restringida al desafío con la cepa homóloga. Así pues, decidimos retomar nuestros ensayos de vacunación en ratón utilizando vacunas ADN que expresan el prión murino.

## **5.2. La vacunación con ADN puede romper la tolerancia frente a la proteína del prión y atenúa la enfermedad tras el desafío intracraneal con el prión infeccioso.**

Como queda patente del primer experimento presentado en la sección de resultados, la vacunación de ratones con ADN expresando la proteína del prión murino fue incapaz de romper la tolerancia (Figura 12 A). Así pues, decidimos utilizar una serie de estrategias de vacunación con ADN, desarrolladas en los últimos años en nuestro laboratorio, encaminadas a potenciar la presentación antigénica del antígeno vacunal (Borrego et al., 2006; Rodriguez et al., 2001; Rodriguez et al., 2002; Rodriguez and Whitton, 2000; Rodriguez et al., 1997; Whitton et al., 1999), en este caso, la proteína del prión. El hecho de que en determinados casos, la optimización de la presentación del antígeno utilizando estas (Xiang et al., 2000) y otras estrategias (Djilali-Saiah et al., 2002; Leitner et al., 2003), ha permitido incluso romper la tolerancia contra un antígeno propio, avalaba esta idea.

Las estrategias escogidas para potenciar la presentación antigénica del prión fueron: i) fusionar la señal de transporte a lisosomas de LIMPII a la molécula del prión murina para dirigirlo al lisosoma y así potenciar su presentación en Clase II y ii) fusionar un monómero de ubiquitina a la molécula del prión murina para dirigirlo al proteasoma y así potenciar su presentación en Clase I.

Inicialmente, los trabajos de inmunización se realizaron sobre ratones transgénicos PrPKO evitando así los problemas de tolerancia debidos a la existencia del gen endógeno de la proteína del prión, para a continuación realizar los experimentos sobre ratones normales (con el gen del prión intacto), en los que la capacidad protectora real de nuestras vacunas podía ser evaluada.

Como era de esperar, la vacunación con pCMV-PrPm (expresando el prión murino por sí sólo), únicamente indujo una respuesta de anticuerpos en ratones PrPKO y no en ratones normales. Correlacionando con su incapacidad para romper la tolerancia (Figura 12 A), la vacuna pCMV-PrPm no resultó protectora (Figura 31). Este resultado contrasta con lo recientemente publicado por Müller y colaboradores, quienes aseguran que una vacuna ADN expresando la PrP bovina completa es capaz de proteger ratones transgénicos que expresan el prión bovino, tras el desafío oral con el agente infeccioso de EEB (Muller et al., 2005). El hecho de que tanto la cepa de ratón, como el origen del material infeccioso y la ruta de infección difieran con lo utilizado por nosotros, pueden explicar estas diferencias. En cualquier caso, la ausencia total de datos sobre la respuesta inmunológica inducida por estas vacunas en el trabajo recién comenzado, permite poner en cuarentena la interpretación de los mecanismos implicados en el retraso observado por estos autores.

De una manera inesperada, la vacunación de ratones PrPKO con la forma ubiquitinada del prión fue capaz de inducir anticuerpos que únicamente reconocían la molécula del prión en Western blot (Figura 25), muy probablemente reflejando la inducción de anticuerpos frente a pequeños péptidos lineales producidos tras el procesamiento en el proteasoma. Este tipo de respuesta coincide con lo observado tras la vacunación de ratones con D178N y E200K, variantes del prión humana eficientemente degradadas en el proteasoma y que eran capaces de inducir anticuerpos que reconocían únicamente el prión en forma desnaturalizada (Figura 17). A pesar de que no se ha podido estudiar mucho más en profundidad, el hecho de que los anticuerpos generados tras la inmunización de ratones PrPKO con pCMV-PrPm y con pCMV-UbPrPm reconozcan más eficientemente una u otra isoforma glicosilada del prión (ambas para PrP<sup>C</sup> y PrP<sup>Sc</sup>), permite hipotetizar con la utilización futura de estas herramientas metodológicas para obtener anticuerpos monoclonales diferenciales de utilidad en diagnóstico. Por otro lado, también resultó sorprendente el hecho de que la vacunación con la forma ubiquitinada del prión murino no rindiera una respuesta celular detectable, ni siquiera en ratones PrPKO. Este resultado puede deberse a diversas razones: por un

lado nuestro protocolo de estimulación *in vitro*, basado en la utilización de extractos semipurificados de proteína, quizás resulte ineficiente a la hora de suministrar los péptidos restringidos por el CMH I que han sido presentados por la vacuna ubiquitinada y por el otro lado, quizás no estemos midiendo las moléculas efectoras adecuadas, que bien podrían ser IL5 o IL10 en lugar de IFN $\gamma$  (iKhalili-Shirazi et al., 2005). A pesar de no haber sido detectada con la metodología aquí utilizada, la hipótesis de que la vacuna ADN expresando la forma ubiquitinada es capaz de inducir una respuesta inmunológica específica contra el prión (muy probablemente de tipo CTL), vendría avalada por el retraso tan significativo en la aparición de síntomas de la enfermedad que se observa en todos y cada uno de los ratones vacunados con pCMV-UbPrPm (Figura 31).

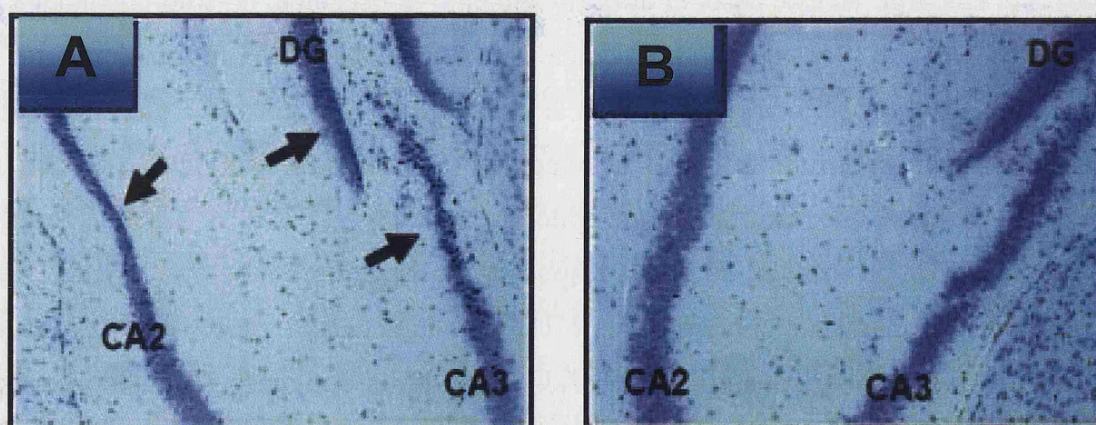
Mucho más significativo aún, resultó el retraso en la aparición de síntomas en los ratones inmunizados con pCMV-PrPmLII, vacuna que expresa el prión fusionado a la señal de direccionamiento al lisosoma de LIMPII. En este caso, la aparición de síntomas se vio retrasada en más del doble respecto a los animales control (Figura 31). La protección observada coincidía al 100% con la potente respuesta inducida por esta vacuna tanto en ratones PrPKO (Figuras 24-27) como en ratones normales (Figuras 28-30), lo que demostraba la capacidad de esta vacuna para romper la tolerancia frente a un antígeno propio. La capacidad de la señal de LII para potenciar la respuesta T cooperadora inducida tras la vacunación con ADN ya había sido previamente demostrada en nuestro laboratorio (Rodríguez et al., 2001; Rodríguez and Whitton, 2000). Sin embargo en este caso, el direccionamiento al lisosoma, no sólo potenciaba la respuesta T-CD4<sup>+</sup> o T cooperadora inducida, sino que además, mejoró también tanto la respuesta T-CD8<sup>+</sup> citotóxica o CTL como la respuesta de anticuerpos. El hecho de que en este caso se haya inmunizado no con un epítipo T cooperador individual sino con un antígeno completo que contiene tanto epítopos B como T (CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>), permite hipotetizar con la posibilidad de que la respuesta T cooperadora inducida, “ayude” a su vez a inducir y mantener una respuesta CTL y de anticuerpos específica. Resultados similares han sido obtenidos con anterioridad para otros antígenos utilizando en este caso la “señal” de transporte al lisosoma de Lamp I, una proteína asociada a membrana lisosomal de tipo I (Bonini et al., 2001).

A pesar de lo prometedor que resultan nuestros resultados de vacunación con pCMV PrPmLII, que permite a los animales vacunados sobrevivir durante un mayor periodo de tiempo sin manifestar síntomas clínicos (más del doble que los controles), lo cierto es que éstos acaban muriendo apenas con dos semanas de retraso respecto a los



animales control. El que estos animales no sufran síntomas severos de la enfermedad en ningún momento, la reducida concentración de PrP<sup>res</sup> observada post-mortem en sus encéfalos, y la celeridad con que los animales pasan de demostrar los primeros síntomas leves de la enfermedad, a morir (apenas una semana), permitieron aventurar que otras causas distintas a la propia progresión de la enfermedad priónica debía ser responsable de la muerte fulminante de los animales vacunados. La reciente publicación de un artículo en la prestigiosa revista *Science*, demostrando la inducción inmediata de apoptosis neuronal directamente tras la inoculación intracraneal de un anticuerpo monoclonal específico contra el prión (Solforosi et al., 2004), permitió hipotetizar con un fenómeno de autoinmunidad producido en los animales vacunados con pCMV-PrPmLII como el responsable del fulminante deceso de los animales.

Con el objetivo de comprobar si los anticuerpos inducidos por la vacunación con pCMV-PrPmLII eran capaces de producir este efecto, se inocularon 20 microlitros de suero procedente de ratones PrPKO inmunizados con pCMV-PrPmLII (con una alta concentración de anticuerpos, ver figura 24) intracranealmente. Para demostrar la especificidad del efecto, se inocularon tanto ratones PrPKO como ratones normales (3 ratones por grupo), expresando estos últimos el prión endógeno en la superficie de las neuronas (entre otras localizaciones). 24 horas tras la inoculación ambos grupos de animales fueron sacrificados para a continuación analizar histológicamente sus encéfalos (Figura 34).



**Figura 34:** Un ratón normal (panel A) y un ratón PrPKO (panel B) fueron inoculados intracranealmente con un suero inactivado obtenido tras inmunizar un ratón PrPKO con pCMV PrPmLII. Se representan los cortes histológicos obtenidos tras tinción con Nissl (ver materiales y métodos). Las flechas indican la presencia de neuronas picnóticas. Las regiones señaladas corresponden a: DG *Dentate Gyrus*, CA2 *Cornu ammonis 2*, CA3 *Cornu ammonis 3*.

El análisis histológico de estos encéfalos reveló la presencia de neuronas picnóticas, típica imagen de muerte neuronal, únicamente en los animales normales inoculados con el suero (panel izquierdo en figura 34). El hecho de que en los animales PrPKO inoculados con el mismo suero no se observara este efecto, demuestra que el efecto ha de estar mediado por PrP<sup>C</sup> presente en la superficie de las neuronas y apoya la hipótesis de que los anticuerpos generados tras la vacunación con pCMV-PrPmLII sean responsables de la fulminante muerte de los animales.

Así pues, la vacunación de ratones con pCMV-PrPmLII induce una potente respuesta inmunológica capaz de retrasar ostensiblemente la aparición de síntomas de la enfermedad y sin embargo, no impide que los animales acaben sucumbiendo sin desarrollar síntomas claros de la enfermedad producida por priones, muy probablemente como consecuencia de un proceso autoinmune, similar al descrito para una vacuna diseñada contra la enfermedad de Alzheimer y que ha provocado la paralización temporal de su uso en humanos (Abbott, 2004). El hecho de que el efecto se observe únicamente en los animales vacunados con pCMV-PrPmLII y sólo muy tarde tras la infección intracraneal, permite suponer que como consecuencia de la infección con el prión o bien de la propia inoculación, la barrera hematoencefálica pueda quedar lo suficientemente permeable como para permitir el trasvase masivo de anticuerpos desde el torrente circulatorio al encéfalo. El hecho de que el efecto apoptótico sobre las neuronas sea dependiente de la concentración de anticuerpo inyectada (Solfrosi et al., 2004) da más peso a esta teoría.

A pesar de los efectos secundarios observados en los animales vacunados, varios son los argumentos que nos permiten ser optimistas en cuanto a la futura utilización de estrategias inmunoterapéuticas similares a las descritas para tratar y/o prevenir las enfermedades producidas por priones:

- i) Independientemente de las consideraciones éticas que se puedan argumentar, lo cierto es que la vacunación de ratones previa al desafío con el prión infeccioso, retrasa la aparición de signos clínicos asociados a la enfermedad a más del doble respecto a los animales control (de 60 a 140 días), permitiendo, en cualquier caso, que los animales vivan una vida totalmente normal y sin síntomas severos de la enfermedad hasta prácticamente el momento de su muerte.
- ii) Los efectos negativos de la vacunación muy probablemente sean debidos a lo agresivo del método de desafío realizado, utilizando la ruta intracraneal. Las vacunas aquí descritas quizás resulten al menos tan eficientes como aquí han demostrado serlo,

si el desafío con el prión infeccioso se realiza utilizando las vías intraperitoneal u oral, rutas fisiológicamente quizás más relevantes. Desafortunadamente, este tipo de experimentos no han podido ser abordados a lo largo de la presente tesis debido entre otras razones: a los largos periodos de incubación requeridos para reproducir la enfermedad utilizando estas rutas de infección y a la dificultad añadida que supone poder distinguir los síntomas clínicos típicos de EET con los derivados del proceso de envejecimiento de los animales. Así por ejemplo, tras la inoculación oral de ratones con el mismo material infeccioso aquí utilizado, se requeriría esperar un periodo de incubación de más de 400 días antes de comenzar a observar los primeros síntomas de la enfermedad, coincidiendo casi con el final de la vida del animal.

iii) Como hemos descrito en la sección de resultados, la protección conferida tras la vacunación de ratones con pCMV-PrPmLII, coincide con la inducción de una potente respuesta de anticuerpos y de células T-CD4<sup>+</sup> y T-CD8<sup>+</sup> específicas contra el prión. Ahora bien, todavía quedan muchas preguntas sin respuesta: ¿Cuál/es es/son el/los mecanismo/s efector/es y/o el/los epítipo/s inmunogénico/s del prión implicado/s en protección? Caracterizando éstos, podría perfectamente diseñarse una vacuna “a la carta” en la que sólo estuvieran contenidos el/los epítopos protectivo/s eliminando aquellos que pudieran estar implicados por ejemplo en inducir anticuerpos capaces de provocar apoptosis neuronal (Solforosi et al., 2004).

Desgraciadamente, a día de hoy la práctica totalidad de los estudios publicados, tanto relacionados con protección (Gilch et al., 2003; Goni et al., 2005; Ishibashi et al., 2006; Magri et al., 2005; Schwarz et al., 2003; Sigurdsson et al., 2002) como con apoptosis neuronal (Solforosi et al., 2004), han ido enfocados a estudiar la respuesta por anticuerpos, siendo muy reducidos los resultados publicados en cuanto a la inducción de respuesta celular (Gregoire et al., 2004; Rosset et al., 2004).

Del mismo modo y en el caso de que se quisiera obtener por ejemplo, una respuesta polivalente frente a muchos epítopos T, en ausencia de anticuerpos, podría plantearse vacunar con una única dosis de pCMV-PrPmLII, que como se ha podido demostrar, es capaz de inducir una potente respuesta T-CD4<sup>+</sup> y T-CD8<sup>+</sup> (Figura 27) en ausencia de anticuerpos, requiriendo éstos últimos la administración de dosis recuerdo vacunales para su inducción. Estos y otros experimentos tales como aquellos encaminados a estudiar la capacidad terapéutica de nuestras vacunas, se encuentran actualmente en la agenda de la investigación futura de nuestro laboratorio.

En definitiva, los resultados presentados en esta tesis demuestran el potencial que la vacunación puede tener como estrategia para ayudar al control de las enfermedades producidas por priones. A pesar de las limitaciones que se derivan de su utilización, el empleo de este tipo de estrategias por ejemplo para intentar retrasar la enfermedad en aquellos individuos condenados a sufrir una encefalopatía hereditaria, bien merece la pena ser explorado.



## 6. CONCLUSIONES

*La ciencia más útil es aquella cuyo fruto es el más comunicable.*

*Leonardo Da Vinci.*



1. Mientras la vacunación de ratones con pCMV-PrPm, expresando la proteína del prión de ratón, es incapaz de inducir una respuesta inmunológica detectable, la vacunación de ratones con pCMV-PrPh, expresando el prión humano, provoca una respuesta específica de anticuerpos capaces de reconocer el prión en su forma nativa.
2. La vacunación de ratones con pCMV-E200K o con pCMV-D178N, expresando las variantes del prión asociadas a CJD familiar o IFF, inducen una respuesta de anticuerpos que reconocen preferentemente al prión en su forma desnaturalizada. La vacunación de ratones con pCMV-A117V, expresando la variante del prión asociadas a GSS no es capaz de inducir respuesta humoral específica alguna.
3. Mientras que la vacunación de ratones con pCMV-E200KET, pCMV-D178NET o pCMV-A117VET, expresando los mutantes patogénicos del prión humano fusionados a ET son capaces de producir una potente respuesta CTL específica capaz de proteger frente al desafío con LCMV, la vacunación con pCMV-PrPhET indujo una pobre respuesta CTL incapaz de resultar protectora frente al virus.
4. Independientemente de la capacidad antigénica e inmunogénica del prión humano o de cada una de las variantes estudiadas, la vacunación de ratones con los plásmidos correspondientes, no es capaz de conferir protección frente al desafío intracraneal con el prión infeccioso adaptado a ratón.
5. La vacunación de cerdos con ADN expresando epítomos del VFA fusionados al péptido señal del prión es capaz de proteger parcialmente frente al desafío con el virus.
6. La vacunación de ratones PrPKO con pCMV-PrPmLII, expresando el prión fusionado a la señal de transporte al lisosoma de LIMP II, potencia tanto la respuesta de anticuerpos como la respuesta celular (de células T-CD8<sup>+</sup> y T-CD4<sup>+</sup>) inducida.



7. La vacunación de ratones con pCMV-PrPmLII es capaz de romper la tolerancia inmunológica, provocando tanto una respuesta de anticuerpos como una respuesta celular específica contra la proteína del prión.
8. La vacunación de ratones con pCMV-PrPmLII es capaz de retrasar la sintomatología clínica de las EETs tras el desafío intracraneal con el prión infeccioso adaptado a ratón.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

*La ciencia avanza a pasos, no a saltos.*

Thomas Macaulay.



- Abbott, A. (2004) Doctors seek lost data on Alzheimer's vaccine. *Nature*, **430**, 715.
- Adorini, L., Moreno, J., Momburg, F., Hammerling, G.J., Guery, J.C., Valli, A. and Fuchs, S. (1991) Exogenous peptides compete for the presentation of endogenous antigens to major histocompatibility complex class II-restricted T cells. *J Exp Med*, **174**, 945-948.
- Aguzzi, A. and Sigurdson, C.J. (2004) Antiprion immunotherapy: to suppress or to stimulate? *Nat Rev Immunol*, **4**, 725-736.
- Alper, T., Cramp, W.A., Haig, D.A. and Clarke, M.C. (1967) Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature*, **214**, 764-766.
- Alper, T., Haig, D.A. and Clarke, M.C. (1966) The exceptionally small size of the scrapie agent. *Biochem Biophys Res Commun*, **22**, 278-284.
- Allen, L.B. and Cochran, K.W. (1977) Acceleration of scrapie in mice by target-organ treatment with interferon inducers. *Ann N Y Acad Sci*, **284**, 676-680.
- Amyx, H., Salazar, A.M., Gajdusek, C.D. and Gibbs, C.J. (1984) Chemotherapeutic trials in experimental slow virus diseases. *Neurology*, **34**.
- An, L.L., Rodriguez, F., Harkins, S., Zhang, J. and Whitton, J.L. (2000) Quantitative and qualitative analyses of the immune responses induced by a multivalent minigene DNA vaccine. *Vaccine*, **18**, 2132-2141.
- An, L.L. and Sette, A. (1999) The multivalent minigene approach to vaccine development. *Expert Opin Investig Drugs*, **8**, 1351-1357.
- Anderson, R.M., Donnelly, C.A., Ferguson, N.M., Woolhouse, M.E., Watt, C.J., Udy, H.J., MaWhinney, S., Dunstan, S.P., Southwood, T.R., Wilesmith, J.W., Ryan, J.B., Hoinville, L.J., Hillerton, J.E., Austin, A.R. and Wells, G.A. (1996) Transmission dynamics and epidemiology of BSE in British cattle. *Nature*, **382**, 779-788.
- Anton, L.C., Schubert, U., Bacik, I., Princiotta, M.F., Wearsch, P.A., Gibbs, J., Day, P.M., Realini, C., Rechsteiner, M.C., Bennink, J.R. and Yewdell, J.W. (1999) Intracellular localization of proteasomal degradation of a viral antigen. *J Cell Biol*, **146**, 113-124.
- Anton, L.C., Yewdell, J.W. and Bennink, J.R. (1997) MHC class I-associated peptides produced from endogenous gene products with vastly different efficiencies. *J Immunol*, **158**, 2535-2542.
- Antony, P.A., Piccirillo, C.A., Akpinarli, A., Finkelstein, S.E., Speiss, P.J., Surman, D.R., Palmer, D.C., Chan, C.C., Klebanoff, C.A., Overwijk, W.W., Rosenberg, S.A. and Restifo, N.P. (2005) CD8<sup>+</sup> T cell immunity against a tumor/self-antigen is augmented by CD4<sup>+</sup> T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells. *J Immunol*, **174**, 2591-2601.

- Aucouturier, P. and Carnaud, C. (2002) The immune system and prion diseases: a relationship of complicity and blindness. *J Leukoc Biol*, **72**, 1075-1083.
- Aucouturier, P., Carp, R.I., Carnaud, C. and Wisniewski, T. (2000) Prion diseases and the immune system. *Clin Immunol*, **96**, 79-85.
- Aucouturier, P., Geissmann, F., Damotte, D., Saborio, G.P., Meeker, H.C., Kascsak, R., Kascsak, R., Carp, R.I. and Wisniewski, T. (2001) Infected splenic dendritic cells are sufficient for prion transmission to the CNS in mouse scrapie. *J Clin Invest*, **108**, 703-708.
- Badovinac, V.P. and Harty, J.T. (2002) CD8(+) T-cell homeostasis after infection: setting the 'curve'. *Microbes Infect*, **4**, 441-447.
- Bainbridge, J. and Walker, K.B. (2005) The normal cellular form of prion protein modulates T cell responses. *Immunol Lett*, **96**, 147-150.
- Baker, C.A., Lu, Z.Y. and Manuelidis, L. (2004) Early induction of interferon-responsive mRNAs in Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurovirol*, **10**, 29-40.
- Baldauf, E., Beekes, M. and Diringer, H. (1997) Evidence for an alternative direct route of access for the scrapie agent to the brain bypassing the spinal cord. *J Gen Virol*, **78** ( Pt 5), 1187-1197.
- Barry, M. and Bleackley, R.C. (2002) Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol*, **2**, 401-409.
- Barry, M.A., Howell, D.P., Andersson, H.A., Chen, J.L. and Singh, R.A. (2004) Expression library immunization to discover and improve vaccine antigens. *Immunol Rev*, **199**, 68-83.
- Bate, C., Reid, S. and Williams, A. (2004) Phospholipase A2 inhibitors or platelet-activating factor antagonists prevent prion replication. *J Biol Chem*, **279**, 36405-36411.
- Beekes, M., Baldauf, E. and Diringer, H. (1996) Sequential appearance and accumulation of pathognomonic markers in the central nervous system of hamsters orally infected with scrapie. *J Gen Virol*, **77** ( Pt 8), 1925-1934.
- Beekes, M. and McBride, P.A. (2000) Early accumulation of pathological PrP in the enteric nervous system and gut-associated lymphoid tissue of hamsters orally infected with scrapie. *Neurosci Lett*, **278**, 181-184.
- Beekes, M., McBride, P.A. and Baldauf, E. (1998) Cerebral targeting indicates vagal spread of infection in hamsters fed with scrapie. *J Gen Virol*, **79** ( Pt 3), 601-607.
- Bendheim, P.E., Barry, R.A., DeArmond, S.J., Stites, D.P. and Prusiner, S.B. (1984) Antibodies to a scrapie prion protein. *Nature*, **310**, 418-421.

- Berg, L.J. (1994) Insights into the role of the immune system in prion diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 429-432.
- Beringue, V., Demoy, M., Lasmezas, C.I., Gouritin, B., Weingarten, C., Deslys, J.P., Andreux, J.P., Couvreur, P. and Dormont, D. (2000) Role of spleen macrophages in the clearance of scrapie agent early in pathogenesis. *J Pathol*, **190**, 495-502.
- Beringue, V., Mallinson, G., Kaisar, M., Tayebi, M., Sattar, Z., Jackson, G., Anstee, D., Collinge, J. and Hawke, S. (2003) Regional heterogeneity of cellular prion protein isoforms in the mouse brain. *Brain*, **126**, 2065-2073.
- Beringue, V., Vilette, D., Mallinson, G., Archer, F., Kaisar, M., Tayebi, M., Jackson, G.S., Clarke, A.R., Laude, H., Collinge, J. and Hawke, S. (2004) PrPSc binding antibodies are potent inhibitors of prion replication in cell lines. *J Biol Chem*, **279**, 39671-39676.
- Berney, C., Herren, S., Power, C.A., Gordon, S., Martinez-Pomares, L. and Kosco-Vilbois, M.H. (1999) A member of the dendritic cell family that enters B cell follicles and stimulates primary antibody responses identified by a mannose receptor fusion protein. *J Exp Med*, **190**, 851-860.
- Blanco, E., Garcia-Briones, M., Sanz-Parra, A., Gomes, P., De Oliveira, E., Valero, M.L., Andreu, D., Ley, V. and Sobrino, F. (2001) Identification of T-cell epitopes in nonstructural proteins of foot-and-mouth disease virus. *J Virol*, **75**, 3164-3174.
- Blanquet-Grossard, F., Thielens, N.M., Vendrely, C., Jamin, M. and Arlaud, G.J. (2005) Complement protein C1q recognizes a conformationally modified form of the prion protein. *Biochemistry*, **44**, 4349-4356.
- Bolton, D.C., McKinley, M.P. and Prusiner, S.B. (1982) Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science*, **218**, 1309-1311.
- Bonifacino, J.S. and Weissman, A.M. (1998) Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **14**, 19-57.
- Bonifaz, L.C., Arzate, S. and Moreno, J. (1999) Endogenous and exogenous forms of the same antigen are processed from different pools to bind MHC class II molecules in endocytic compartments. *Eur J Immunol*, **29**, 119-131.
- Bonini, C., Lee, S.P., Riddell, S.R. and Greenberg, P.D. (2001) Targeting antigen in mature dendritic cells for simultaneous stimulation of CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol*, **166**, 5250-5257.
- Borchelt, D.R., Scott, M., Taraboulos, A., Stahl, N. and Prusiner, S.B. (1990) Scrapie and cellular prion proteins differ in their kinetics of synthesis and topology in cultured cells. *J Cell Biol*, **110**, 743-752.

- Borrego, B., Fernandez-Pacheco, P., Ganges, L., Domenech, N., Fernandez-Borges, N., Sobrino, F. and Rodriguez, F. (2006) DNA vaccines expressing B and T cell epitopes can protect mice from FMDV infection in the absence of specific humoral responses. *Vaccine*, **24**, 3889-3899.
- Botija, C.S. (1970) [Diagnosis of African swine fever by immunofluorescence]. *Bull Off Int Epizoot*, **73**, 1025-1044.
- Boyle, J.S., Brady, J.L. and Lew, A.M. (1998) Enhanced responses to a DNA vaccine encoding a fusion antigen that is directed to sites of immune induction. *Nature*, **392**, 408-411.
- Brown, D.R. and Besinger, A. (1998) Prion protein expression and superoxide dismutase activity. *Biochem J*, **334** ( Pt 2), 423-429.
- Brown, D.R., Qin, K., Herms, J.W., Madlung, A., Manson, J., Strome, R., Fraser, P.E., Kruck, T., von Bohlen, A., Schulz-Schaeffer, W., Giese, A., Westaway, D. and Kretzschmar, H. (1997) The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature*, **390**, 684-687.
- Brown, K.L., Stewart, K., Ritchie, D.L., Mabbott, N.A., Williams, A., Fraser, H., Morrison, W.I. and Bruce, M.E. (1999) Scrapie replication in lymphoid tissues depends on prion protein-expressing follicular dendritic cells. *Nat Med*, **5**, 1308-1312.
- Bruce, M.E., Will, R.G., Ironside, J.W., McConnell, I., Drummond, D., Suttie, A., McCardle, L., Chree, A., Hope, J., Birkett, C., Cousens, S., Fraser, H. and Bostock, C.J. (1997) Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature*, **389**, 498-501.
- Brun, A., Castilla, J., Parra, B., Rodriguez, F. and Torres, J.M. (2003) [Involvement of the immunological system in the pathogenesis of transmissible spongiform encephalopathies]. *Rev Neurol*, **37**, 648-653.
- Brun, A., Castilla, J., Ramirez, M.A., Prager, K., Parra, B., Salguero, F.J., Shiveral, D., Sanchez, C., Sanchez-Vizcaino, J.M., Douglas, A. and Torres, J.M. (2004) Proteinase K enhanced immunoreactivity of the prion protein-specific monoclonal antibody 2A11. *Neurosci Res*, **48**, 75-83.
- Buch, T. and Waisman, A. (2006) Protection from autoimmunity by DNA vaccination against T-cell receptor. *Methods Mol Med*, **127**, 269-280.
- Bueler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R.A., Autenried, P., Aguet, M. and Weissmann, C. (1993) Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell*, **73**, 1339-1347.
- Bueler, H., Raeber, A., Sailer, A., Fischer, M., Aguzzi, A. and Weissmann, C. (1994) High prion and PrPSc levels but delayed onset of disease in scrapie-inoculated mice heterozygous for a disrupted PrP gene. *Mol Med*, **1**, 19-30.

- Burns, C.S., Aronoff-Spencer, E., Legname, G., Prusiner, S.B., Antholine, W.E., Gerfen, G.J., Peisach, J. and Millhauser, G.L. (2003) Copper coordination in the full-length, recombinant prion protein. *Biochemistry*, **42**, 6794-6803.
- Byrne, S.N. and Halliday, G.M. (2002) Dendritic cells: making progress with tumour regression? *Immunol Cell Biol*, **80**, 520-530.
- Calin-Laurens, V., Forquet, F., Lombard-Platet, S., Bertolino, P., Chretien, I., Trescol-Biemont, M.C., Gerlier, D. and Rabourdin-Combe, C. (1992) High efficiency of endogenous antigen presentation by MHC class II molecules. *Int Immunol*, **4**, 1113-1121.
- Capellari, S., Cardone, F., Notari, S., Schinina, M.E., Maras, B., Sita, D., Baruzzi, A., Pocchiari, M. and Parchi, P. (2005) Creutzfeldt-Jakob disease associated with the R208H mutation in the prion protein gene. *Neurology*, **64**, 905-907.
- Capellari, S., Parchi, P., Russo, C.M., Sanford, J., Sy, M.S., Gambetti, P. and Petersen, R.B. (2000) Effect of the E200K mutation on prion protein metabolism. Comparative study of a cell model and human brain. *Am J Pathol*, **157**, 613-622.
- Carp, R.I. (1982) Transmission of scrapie by oral route: effect of gingival scarification. *Lancet*, **1**, 170-171.
- Carp, R.I. and Callahan, S.M. (1981) In vitro interaction of scrapie agent and mouse peritoneal macrophages. *Intervirology*, **16**, 8-13.
- Carp, R.I. and Callahan, S.M. (1982) Effect of mouse peritoneal macrophages on scrapie infectivity during extended in vitro incubation. *Intervirology*, **17**, 201-207.
- Cashman, N.R., Loertscher, R., Nalbantoglu, J., Shaw, I., Kascsak, R.J., Bolton, D.C. and Bendheim, P.E. (1990) Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation. *Cell*, **61**, 185-192.
- Castilla, J., Brun, A., Diaz-San Segundo, F., Salguero, F.J., Gutierrez-Adan, A., Pintado, B., Ramirez, M.A., del Riego, L. and Torres, J.M. (2005) Vertical transmission of bovine spongiform encephalopathy prions evaluated in a transgenic mouse model. *J Virol*, **79**, 8665-8668.
- Caughey, B., Kocisko, D.A., Raymond, G.J. and Lansbury, P.T., Jr. (1995) Aggregates of scrapie-associated prion protein induce the cell-free conversion of protease-sensitive prion protein to the protease-resistant state. *Chem Biol*, **2**, 807-817.
- Caughey, B. and Race, R.E. (1992) Potent inhibition of scrapie-associated PrP accumulation by congo red. *J Neurochem*, **59**, 768-771.
- Caughey, B. and Raymond, G.J. (1991) The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease- and phospholipase-sensitive. *J Biol Chem*, **266**, 18217-18223.



- Caughey, B. and Raymond, G.J. (1993) Sulfated polyanion inhibition of scrapie-associated PrP accumulation in cultured cells. *J Virol*, **67**, 643-650.
- Caughey, B., Raymond, L.D., Raymond, G.J., Maxson, L., Silveira, J. and Baron, G.S. (2003) Inhibition of protease-resistant prion protein accumulation in vitro by curcumin. *J Virol*, **77**, 5499-5502.
- Ciernik, I.F., Berzofsky, J.A. and Carbone, D.P. (1996) Induction of cytotoxic T lymphocytes and antitumor immunity with DNA vaccines expressing single T cell epitopes. *J Immunol*, **156**, 2369-2375.
- Clarke, M.C. and Kimberlin, R.H. (1984) Pathogenesis of mouse scrapie: distribution of agent in the pulp and stroma of infected spleens. *Vet Microbiol*, **9**, 215-225.
- Cohen, F.E., Pan, K.M., Huang, Z., Baldwin, M., Fletterick, R.J. and Prusiner, S.B. (1994) Structural clues to prion replication. *Science*, **264**, 530-531.
- Cohen, F.E. and Prusiner, S.B. (1998) Pathologic conformations of prion proteins. *Annu Rev Biochem*, **67**, 793-819.
- Cohen, J. (2005) Can we selectively shut off immune responses? *Science*, **309**, 97.
- Collen, T., Pullen, L. and Doel, T.R. (1989) T cell-dependent induction of antibody against foot-and-mouth disease virus in a mouse model. *J Gen Virol*, **70** ( Pt 2), 395-403.
- Collinge, J. (2001) Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. *Annu Rev Neurosci*, **24**, 519-550.
- Collinge, J., Palmer, M.S. and Dryden, A.J. (1991) Genetic predisposition to iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet*, **337**, 1441-1442.
- Collinge, J., Palmer, M.S., Sidle, K.C., Gowland, I., Medori, R., Ironside, J. and Lantos, P. (1995) Transmission of fatal familial insomnia to laboratory animals. *Lancet*, **346**, 569-570.
- Collinge, J., Whittington, M.A., Sidle, K.C., Smith, C.J., Palmer, M.S., Clarke, A.R. and Jefferys, J.G. (1994) Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature*, **370**, 295-297.
- Creutzfeldt, H.G. (1920) Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. Vorläufige Mitteilung. *Zeitschrift für die Gesamte Neurologie und Psychiatrie*, **57**, 1-18.
- Cuille, J. and Chelle, P.L. (1936) La maladie dite tremblante du mouton est-elle inoculable? *C R Acad Sci*, **203**, 1552-1554.
- Check, E. (2002) Nerve inflammation halts trial for Alzheimer's drug. *Nature*, **415**, 462.

- Chen, S.G. and Gambetti, P. (2002) A journey through the species barrier. *Neuron*, **34**, 854-856.
- Chesebro, B. (2002) Grand ideas floating freely. Conference on the new prion biology: basic science, diagnosis and therapy. *EMBO Rep*, **3**, 1123-1126.
- Chesebro, B., Race, R., Wehrly, K., Nishio, J., Bloom, M., Lechner, D., Bergstrom, S., Robbins, K., Mayer, L., Keith, J.M. and et al. (1985) Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature*, **315**, 331-333.
- Davis, B.S., Chang, G.J., Cropp, B., Roehrig, J.T., Martin, D.A., Mitchell, C.J., Bowen, R. and Bunning, M.L. (2001) West Nile virus recombinant DNA vaccine protects mouse and horse from virus challenge and expresses in vitro a noninfectious recombinant antigen that can be used in enzyme-linked immunosorbent assays. *J Virol*, **75**, 4040-4047.
- Davis, H.L. and Whalen, R.G. (1995) DNA-based immunization. *Mol Cell Biol Hum Dis Ser*, **5**, 368-387.
- De Marco, F., Hallez, S., Brulet, J.M., Gesche, F., Marzano, P., Flamini, S., Marcante, M.L. and Venuti, A. (2003) DNA vaccines against HPV-16 E7-expressing tumour cells. *Anticancer Res*, **23**, 1449-1454.
- Dealler, S. (1997) The key must fit: macrophages transport prion infection to the central nervous system and may determine the sites of infection within it. *Med Hypotheses*, **49**, 213-220.
- Defaweux, V., Dorban, G., Demonceau, C., Piret, J., Jolois, O., Thellin, O., Thielen, C., Heinen, E. and Antoine, N. (2005) Interfaces between dendritic cells, other immune cells, and nerve fibres in mouse Peyer's patches: potential sites for neuroinvasion in prion diseases. *Microsc Res Tech*, **66**, 1-9.
- Del Val, M., Schlicht, H.J., Volkmer, H., Messerle, M., Reddehase, M.J. and Koszinowski, U.H. (1991) Protection against lethal cytomegalovirus infection by a recombinant vaccine containing a single nonameric T-cell epitope. *J Virol*, **65**, 3641-3646.
- Deliyannis, G., Boyle, J.S., Brady, J.L., Brown, L.E. and Lew, A.M. (2000) A fusion DNA vaccine that targets antigen-presenting cells increases protection from viral challenge. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 6676-6680.
- Deng, X. and Cai, M. (2003) [Mechanism of priming cytotoxic T cell response and strategy for enhancing DNA vaccine potency in DNA immunization]. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*, **20**, 175-179.
- Denzer, K., Kleijmeer, M.J., Heijnen, H.F., Stoorvogel, W. and Geuze, H.J. (2000) Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *J Cell Sci*, **113 Pt 19**, 3365-3374.

- Dickinson, A.G. (1976) Scrapie in sheep and goats. *Front Biol*, **44**, 209-241.
- Djilali-Saiah, I., Lapierre, P., Vittozi, S. and Alvarez, F. (2002) DNA vaccination breaks tolerance for a neo-self antigen in liver: a transgenic murine model of autoimmune hepatitis. *J Immunol*, **169**, 4889-4896.
- Doh-ura, K., Tateishi, J., Sasaki, H., Kitamoto, T. and Sakaki, Y. (1989) Pro----leu change at position 102 of prion protein is the most common but not the sole mutation related to Gerstmann-Straussler syndrome. *Biochem Biophys Res Commun*, **163**, 974-979.
- Donnelly, J.J., Liu, M.A. and Ulmer, J.B. (2000) Antigen presentation and DNA vaccines. *Am J Respir Crit Care Med*, **162**, S190-193.
- Donofrio, G., Heppner, F.L., Polymenidou, M., Musahl, C. and Aguzzi, A. (2005) Paracrine inhibition of prion propagation by anti-PrP single-chain Fv miniantibodies. *J Virol*, **79**, 8330-8338.
- Eklund, C.M., Kennedy, R.C. and Hadlow, W.J. (1967) Pathogenesis of scrapie virus infection in the mouse. *J Infect Dis*, **117**, 15-22.
- Ellgaard, L., Molinari, M. and Helenius, A. (1999) Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science*, **286**, 1882-1888.
- Enari, M., Flechsig, E. and Weissmann, C. (2001) Scrapie prion protein accumulation by scrapie-infected neuroblastoma cells abrogated by exposure to a prion protein antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 9295-9299.
- Endo, T., Groth, D., Prusiner, S.B. and Kobata, A. (1989) Diversity of oligosaccharide structures linked to asparagines of the scrapie prion protein. *Biochemistry*, **28**, 8380-8388.
- Ertmer, A., Gilch, S., Yun, S.W., Flechsig, E., Klebl, B., Stein-Gerlach, M., Klein, M.A. and Schatzl, H.M. (2004) The tyrosine kinase inhibitor STI571 induces cellular clearance of PrPSc in prion-infected cells. *J Biol Chem*, **279**, 41918-41927.
- Fevrier, B., Vilette, D., Archer, F., Loew, D., Faigle, W., Vidal, M., Laude, H. and Raposo, G. (2004) Cells release prions in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 9683-9688.
- Field, E.J., Joyce, G. and Keith, A. (1969) Failure of interferon to modify scrapie in the mouse. *J Gen Virol*, **5**, 149-150.
- Fischer, M., Rulicke, T., Raeber, A., Sailer, A., Moser, M., Oesch, B., Brandner, S., Aguzzi, A. and Weissmann, C. (1996) Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *Embo J*, **15**, 1255-1264.

- Foster, J.D., Parnham, D.W., Hunter, N. and Bruce, M. (2001) Distribution of the prion protein in sheep terminally affected with BSE following experimental oral transmission. *J Gen Virol*, **82**, 2319-2326.
- Foti, M., Granucci, F., Pelizzola, M., Beretta, O. and Ricciardi-Castagnoli, P. (2006) Dendritic cells in pathogen recognition and induction of immune responses: a functional genomics approach. *J Leukoc Biol*, **79**, 913-916.
- Fraser, H. and Dickinson, A.G. (1970) Pathogenesis of scrapie in the mouse: the role of the spleen. *Nature*, **226**, 462-463.
- Fraser, H. and Farquhar, C.F. (1987) Ionising radiation has no influence on scrapie incubation period in mice. *Vet Microbiol*, **13**, 211-223.
- Frauenfelder, H., Sligar, S.G. and Wolynes, P.G. (1991) The energy landscapes and motions of proteins. *Science*, **254**, 1598-1603.
- Fujii, S., Senju, S., Chen, Y.Z., Ando, M., Matsushita, S. and Nishimura, Y. (1998) The CLIP-substituted invariant chain efficiently targets an antigenic peptide to HLA class II pathway in L cells. *Hum Immunol*, **59**, 607-614.
- Fuller, D.H., Loudon, P. and Schmaljohn, C. (2006) Preclinical and clinical progress of particle-mediated DNA vaccines for infectious diseases. *Methods*, **40**, 86-97.
- Gabizon, R., McKinley, M.P., Groth, D. and Prusiner, S.B. (1988) Immunoaffinity purification and neutralization of scrapie prion infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 6617-6621.
- Gabizon, R. and Prusiner, S.B. (1990) Prion liposomes. *Biochem J*, **266**, 1-14.
- Gajdusek, D.C. and Zigas, V. (1957) Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea; the endemic occurrence of kuru in the native population. *N Engl J Med*, **257**, 974-978.
- Galloway, D.R. and Baillie, L. (2004) DNA vaccines against anthrax. *Expert Opin Biol Ther*, **4**, 1661-1667.
- Ganges, L., Barrera, M., Nunez, J.I., Blanco, I., Frias, M.T., Rodriguez, F. and Sobrino, F. (2005) A DNA vaccine expressing the E2 protein of classical swine fever virus elicits T cell responses that can prime for rapid antibody production and confer total protection upon viral challenge. *Vaccine*, **23**, 3741-3752.
- Gerstmann, J. (1928) Über ein noch nicht beschriebenes Reflexphänomen bei einer Erkrankung des Zerebellären Systems. *Wien Medizin Wochenschr*, **78**, 906-908.
- Gerstmann, J., Sträussler, E. and Scheinker, I. (1936) Über eine eigenartige hereditär-familiäre Erkrankung des Zentralnervensystems. Zugleich ein Beitrag zur Frage des vorzeitigen lokalen Alterns. *Z Neurol*, **154**, 736-762.

- Gilch, S., Wopfner, F., Renner-Muller, I., Kremmer, E., Bauer, C., Wolf, E., Brem, G., Groschup, M.H. and Schatzl, H.M. (2003) Polyclonal anti-PrP auto-antibodies induced with dimeric PrP interfere efficiently with PrPSc propagation in prion-infected cells. *J Biol Chem*, **278**, 18524-18531.
- Glatzel, M., Abela, E., Maissen, M. and Aguzzi, A. (2003) Extraneural pathologic prion protein in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med*, **349**, 1812-1820.
- Goldfarb, L.G., Brown, P., Mitrova, E., Cervenakova, L., Goldin, L., Korczyn, A.D., Chapman, J., Galvez, S., Cartier, L., Rubenstein, R. and et al. (1991a) Creutzfeldt-Jacob disease associated with the PRNP codon 200Lys mutation: an analysis of 45 families. *Eur J Epidemiol*, **7**, 477-486.
- Goldfarb, L.G., Haltia, M., Brown, P., Nieto, A., Kovanen, J., McCombie, W.R., Trapp, S. and Gajdusek, D.C. (1991b) New mutation in scrapie amyloid precursor gene (at codon 178) in Finnish Creutzfeldt-Jakob kindred. *Lancet*, **337**, 425.
- Goldfarb, L.G., Petersen, R.B., Tabaton, M., Brown, P., LeBlanc, A.C., Montagna, P., Cortelli, P., Julien, J., Vital, C., Pendelbury, W.W. and et al. (1992) Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease: disease phenotype determined by a DNA polymorphism. *Science*, **258**, 806-808.
- Goldgaber, D., Goldfarb, L.G., Brown, P., Asher, D.M., Brown, W.T., Lin, S., Teener, J.W., Feinstone, S.M., Rubenstein, R., Kascsak, R.J. and et al. (1989) Mutations in familial Creutzfeldt-Jakob disease and Gerstmann-Straussler-Scheinker's syndrome. *Exp Neurol*, **106**, 204-206.
- Goldmann, W., Hunter, N., Smith, G., Foster, J. and Hope, J. (1994) PrP genotype and agent effects in scrapie: change in allelic interaction with different isolates of agent in sheep, a natural host of scrapie. *J Gen Virol*, **75** ( Pt 5), 989-995.
- Goni, F., Knudsen, E., Schreiber, F., Scholtzova, H., Pankiewicz, J., Carp, R., Meeker, H.C., Rubenstein, R., Brown, D.R., Sy, M.S., Chabalgoity, J.A., Sigurdsson, E.M. and Wisniewski, T. (2005) Mucosal vaccination delays or prevents prion infection via an oral route. *Neuroscience*, **133**, 413-421.
- Gould, S.J., Booth, A.M. and Hildreth, J.E. (2003) The Trojan exosome hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 10592-10597.
- Gregoire, S., Logre, C., Metharom, P., Loing, E., Chomilier, J., Rosset, M.B., Aucouturier, P. and Carnaud, C. (2004) Identification of two immunogenic domains of the prion protein--PrP--which activate class II-restricted T cells and elicit antibody responses against the native molecule. *J Leukoc Biol*, **76**, 125-134.
- Gresser, I., Maury, C. and Chandler, R.L. (1983) Failure to modify scrapie in mice by administration of interferon or anti-interferon globulin. *J Gen Virol*, **64** (Pt 6), 1387-1389.

- Gresser, I. and Pattison, I.H. (1968) An attempt to modify scrapie in mice by the administration of interferon. *J Gen Virol*, **3**, 295-297.
- Griffith, J.S. (1967) Self-replication and scrapie. *Nature*, **215**, 1043-1044.
- Haberman, A.M. and Shlomchik, M.J. (2003) Reassessing the function of immune-complex retention by follicular dendritic cells. *Nat Rev Immunol*, **3**, 757-764.
- Hadlow, W.J., Race, R.E. and Kennedy, R.C. (1987) Temporal distribution of transmissible mink encephalopathy virus in mink inoculated subcutaneously. *J Virol*, **61**, 3235-3240.
- Haik, S., Faucheux, B.A., Sazdovitch, V., Privat, N., Kemeny, J.L., Perret-Liaudet, A. and Hauw, J.J. (2003) The sympathetic nervous system is involved in variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Nat Med*, **9**, 1121-1123.
- Hammerberg, C. and Schurig, G.G. (1986) Characterization of monoclonal antibodies directed against swine leukocytes. *Vet Immunol Immunopathol*, **11**, 107-121.
- Haraguchi, T., Fisher, S., Olofsson, S., Endo, T., Groth, D., Tarentino, A., Borchelt, D.R., Teplow, D., Hood, L., Burlingame, A. and et al. (1989) Asparagine-linked glycosylation of the scrapie and cellular prion proteins. *Arch Biochem Biophys*, **274**, 1-13.
- Harris, D.A. (1999a) Cell biological studies of the prion protein. *Curr Issues Mol Biol*, **1**, 65-75.
- Harris, D.A. (1999b) Cellular biology of prion diseases. *Clin Microbiol Rev*, **12**, 429-444.
- Hartl, A., Weiss, R., Hochreiter, R., Scheiblhofer, S., Bauer, R., Valenta, R., Ferreira, F., Leitner, W. and Thalhamer, J. (2003) Strategies for the development of safe and effective DNA vaccines for allergy treatment. *Arb Paul Ehrlich Inst Bundesamt Sera Impfstoffe Frankf A M*, 279-298; discussion 299.
- Heggebo, R., Gonzalez, L., Press, C.M., Gunnes, G., Espenes, A. and Jeffrey, M. (2003) Disease-associated PrP in the enteric nervous system of scrapie-affected Suffolk sheep. *J Gen Virol*, **84**, 1327-1338.
- Heikenwalder, M., Polymenidou, M., Junt, T., Sigurdson, C., Wagner, H., Akira, S., Zinkernagel, R. and Aguzzi, A. (2004) Lymphoid follicle destruction and immunosuppression after repeated CpG oligodeoxynucleotide administration. *Nat Med*, **10**, 187-192.
- Heppner, F.L. and Aguzzi, A. (2004) Recent developments in prion immunotherapy. *Curr Opin Immunol*, **16**, 594-598.
- Heppner, F.L., Christ, A.D., Klein, M.A., Prinz, M., Fried, M., Kraehenbuhl, J.P. and Aguzzi, A. (2001a) Transepithelial prion transport by M cells. *Nat Med*, **7**, 976-977.

- Heppner, F.L., Musahl, C., Arrighi, I., Klein, M.A., Rulicke, T., Oesch, B., Zinkernagel, R.M., Kalinke, U. and Aguzzi, A. (2001b) Prevention of scrapie pathogenesis by transgenic expression of anti-prion protein antibodies. *Science*, **294**, 178-182.
- Herms, J., Tings, T., Gall, S., Madlung, A., Giese, A., Siebert, H., Schurmann, P., Windl, O., Brose, N. and Kretzschmar, H. (1999) Evidence of presynaptic location and function of the prion protein. *J Neurosci*, **19**, 8866-8875.
- Hilton, D.A. (2006) Pathogenesis and prevalence of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *J Pathol*, **208**, 134-141.
- Hilton, D.A., Fathers, E., Edwards, P., Ironside, J.W. and Zajicek, J. (1998) Prion immunoreactivity in appendix before clinical onset of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet*, **352**, 703-704.
- Hill, A.F., Joiner, S., Linehan, J., Desbruslais, M., Lantos, P.L. and Collinge, J. (2000) Species-barrier-independent prion replication in apparently resistant species. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 10248-10253.
- Hosoi, J., Murphy, G.F., Egan, C.L., Lerner, E.A., Grabbe, S., Asahina, A. and Granstein, R.D. (1993) Regulation of Langerhans cell function by nerves containing calcitonin gene-related peptide. *Nature*, **363**, 159-163.
- Hsiao, K., Baker, H.F., Crow, T.J., Poulter, M., Owen, F., Terwilliger, J.D., Westaway, D., Ott, J. and Prusiner, S.B. (1989) Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Straussler syndrome. *Nature*, **338**, 342-345.
- Hsiao, K.K., Scott, M., Foster, D., Groth, D.F., DeArmond, S.J. and Prusiner, S.B. (1990) Spontaneous neurodegeneration in transgenic mice with mutant prion protein. *Science*, **250**, 1587-1590.
- Huang, F.P., Farquhar, C.F., Mabbott, N.A., Bruce, M.E. and MacPherson, G.G. (2002) Migrating intestinal dendritic cells transport PrP(Sc) from the gut. *J Gen Virol*, **83**, 267-271.
- Huang, Z., Prusiner, S.B. and Cohen, F.E. (1996) Scrapie prions: a three-dimensional model of an infectious fragment. *Fold Des*, **1**, 13-19.
- Hung, C.F. and Wu, T.C. (2003) Improving DNA vaccine potency via modification of professional antigen presenting cells. *Curr Opin Mol Ther*, **5**, 20-24.
- Hurtley, S.M. and Helenius, A. (1989) Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Cell Biol*, **5**, 277-307.
- Hutter, G., Heppner, F.L. and Aguzzi, A. (2003) No superoxide dismutase activity of cellular prion protein in vivo. *Biol Chem*, **384**, 1279-1285.
- iKhalili-Shirazi, A., Quarantino, S., Londei, M., Summers, L., Tayebi, M., Clarke, A.R., Hawke, S.H., Jackson, G.S. and Collinge, J. (2005) Protein conformation

- significantly influences immune responses to prion protein. *J Immunol*, **174**, 3256-3263.
- Imazeki, N., Senoo, A. and Fuse, Y. (1992) Is the follicular dendritic cell a primarily stationary cell? *Immunology*, **76**, 508-510.
- Ingram, D.K. (2001) Vaccine development for Alzheimer's disease: a shot of good news. *Trends Neurosci*, **24**, 305-307.
- Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, **96**, 23-28.
- Ishibashi, D., Yamanaka, H., Yamaguchi, N., Yoshikawa, D., Nakamura, R., Okimura, N., Yamaguchi, Y., Shigematsu, K., Katamine, S. and Sakaguchi, S. (2006) Immunization with recombinant bovine but not mouse prion protein delays the onset of disease in mice inoculated with a mouse-adapted prion. *Vaccine*.
- Ivanova, L., Barmada, S., Kummer, T. and Harris, D.A. (2001) Mutant prion proteins are partially retained in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, **276**, 42409-42421.
- Jakob, A. (1921a) Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischem Befunde (spastische Pseudosklerose-Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden). Vorläufige Mitteilung. *Deut Z Nervenheilk*, **70**, 132-146.
- Jakob, A. (1921b) Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischen Befunde (spastische Pseudosklerose-Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden). *Zeitschrift für die Gesamte Neurologie und Psychiatrie*, **64**, 147-228.
- Jakob, A. (1921c) Über eine der multiplen Sklerose klinisch nahestehende Erkrankung des Zentralnervensystems (spastische Pseudosklerose) mit bemerkenswertem anatomischem Befunde. Mitteilung eines vierten Falles. *Med Klin*, **13**, 372-376.
- Janus, C., Chishti, M.A. and Westaway, D. (2000) Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*, **1502**, 63-75.
- Jeffrey, M., Begara-McGorum, I., Clark, S., Martin, S., Clark, J., Chaplin, M. and Gonzalez, L. (2002) Occurrence and distribution of infection-specific PrP in tissues of clinical scrapie cases and cull sheep from scrapie-affected farms in Shetland. *J Comp Pathol*, **127**, 264-273.
- Jeffrey, M., Goodbrand, I.A. and Goodsir, C.M. (1995) Pathology of the transmissible spongiform encephalopathies with special emphasis on ultrastructure. *Micron*, **26**, 277-298.
- Jeffrey, M., Goodsir, C.M., Holliman, A., Higgins, R.J., Bruce, M.E., McBride, P.A. and Fraser, J.R. (1998) Determination of the frequency and distribution of



- vascular and parenchymal amyloid with polyclonal and N-terminal-specific PrP antibodies in scrapie-affected sheep and mice. *Vet Rec*, **142**, 534-537.
- Jeffrey, M., McGovern, G., Goodsir, C.M., Brown, K.L. and Bruce, M.E. (2000) Sites of prion protein accumulation in scrapie-infected mouse spleen revealed by immuno-electron microscopy. *J Pathol*, **191**, 323-332.
- Jeffrey, W., Pollard, J.M., Walker, E., Murray, J., K., M. and Collins, L. (1994) *Methods in Molecular Biology*. Humana Press.
- Ji, H., Wang, T.L., Chen, C.H., Pai, S.I., Hung, C.F., Lin, K.Y., Kurman, R.J., Pardoll, D.M. and Wu, T.C. (1999) Targeting human papillomavirus type 16 E7 to the endosomal/lysosomal compartment enhances the antitumor immunity of DNA vaccines against murine human papillomavirus type 16 E7-expressing tumors. *Hum Gene Ther*, **10**, 2727-2740.
- Jiao, J.G., Li, Y.N., Wang, H., Liu, Q., Cao, J.X., Bai, R.Z. and Huang, F.Y. (2006) A plasmid DNA vaccine encoding the extracellular domain of porcine endoglin induces anti-tumour immune response against self-endoglin-related angiogenesis in two liver cancer models. *Dig Liver Dis*, **38**, 578-587.
- Jin, T., Gu, Y., Zanusso, G., Sy, M., Kumar, A., Cohen, M., Gambetti, P. and Singh, N. (2000) The chaperone protein BiP binds to a mutant prion protein and mediates its degradation by the proteasome. *J Biol Chem*, **275**, 38699-38704.
- Jobling, M.F., Huang, X., Stewart, L.R., Barnham, K.J., Curtain, C., Volitakis, I., Perugini, M., White, A.R., Cherny, R.A., Masters, C.L., Barrow, C.J., Collins, S.J., Bush, A.I. and Cappai, R. (2001) Copper and zinc binding modulates the aggregation and neurotoxic properties of the prion peptide PrP106-126. *Biochemistry*, **40**, 8073-8084.
- Kaneider, N.C., Kaser, A., Dunzendorfer, S., Tilg, H., Patsch, J.R. and Wiedermann, C.J. (2005) Neurokinin-1 receptor interacts with PrP(106-126)-induced dendritic cell migration and maturation. *J Neuroimmunol*, **158**, 153-158.
- Kaneider, N.C., Kaser, A., Dunzendorfer, S., Tilg, H. and Wiedermann, C.J. (2003) Sphingosine kinase-dependent migration of immature dendritic cells in response to neurotoxic prion protein fragment. *J Virol*, **77**, 5535-5539.
- Kapasi, Z.F., Burton, G.F., Shultz, L.D., Tew, J.G. and Szakal, A.K. (1993) Induction of functional follicular dendritic cell development in severe combined immunodeficiency mice. Influence of B and T cells. *J Immunol*, **150**, 2648-2658.
- Kascsak, R.J., Rubenstein, R., Merz, P.A., Tonna-DeMasi, M., Fersko, R., Carp, R.I., Wisniewski, H.M. and Diringer, H. (1987) Mouse polyclonal and monoclonal antibody to scrapie-associated fibril proteins. *J Virol*, **61**, 3688-3693.

- Kimberlin, R.H., Cole, S. and Walker, C.A. (1987) Temporary and permanent modifications to a single strain of mouse scrapie on transmission to rats and hamsters. *J Gen Virol*, **68** ( Pt 7), 1875-1881.
- Kimberlin, R.H. and Walker, C.A. (1979) Pathogenesis of mouse scrapie: dynamics of agent replication in spleen, spinal cord and brain after infection by different routes. *J Comp Pathol*, **89**, 551-562.
- Kimberlin, R.H., Walker, C.A. and Fraser, H. (1989) The genomic identity of different strains of mouse scrapie is expressed in hamsters and preserved on reisolation in mice. *J Gen Virol*, **70** ( Pt 8), 2017-2025.
- Kitamoto, T., Muramoto, T., Mohri, S., Doh-Ura, K. and Tateishi, J. (1991) Abnormal isoform of prion protein accumulates in follicular dendritic cells in mice with Creutzfeldt-Jakob disease. *J Virol*, **65**, 6292-6295.
- Klavinskis, L.S., Whitton, J.L., Joly, E. and Oldstone, M.B. (1990) Vaccination and protection from a lethal viral infection: identification, incorporation, and use of a cytotoxic T lymphocyte glycoprotein epitope. *Virology*, **178**, 393-400.
- Klein, M.A., Frigg, R., Flechsig, E., Raeber, A.J., Kalinke, U., Bluethmann, H., Bootz, F., Suter, M., Zinkernagel, R.M. and Aguzzi, A. (1997) A crucial role for B cells in neuroinvasive scrapie. *Nature*, **390**, 687-690.
- Klein, M.A., Kaeser, P.S., Schwarz, P., Weyd, H., Xenarios, I., Zinkernagel, R.M., Carroll, M.C., Verbeek, J.S., Botto, M., Walport, M.J., Molina, H., Kalinke, U., Acha-Orbea, H. and Aguzzi, A. (2001) Complement facilitates early prion pathogenesis. *Nat Med*, **7**, 488-492.
- Kooyman, D.L., Byrne, G.W. and Logan, J.S. (1998) Glycosyl phosphatidylinositol anchor. *Exp Nephrol*, **6**, 148-151.
- Korth, C., Stierli, B., Streit, P., Moser, M., Schaller, O., Fischer, R., Schulz-Schaeffer, W., Kretzschmar, H., Raeber, A., Braun, U., Ehrensperger, F., Hornemann, S., Glockshuber, R., Riek, R., Billeter, M., Wuthrich, K. and Oesch, B. (1997) Prion (PrP<sup>Sc</sup>)-specific epitope defined by a monoclonal antibody. *Nature*, **390**, 74-77.
- Kosco-Vilbois, M.H. (2003) Are follicular dendritic cells really good for nothing? *Nat Rev Immunol*, **3**, 764-769.
- Krasemann, S., Groschup, M.H., Harmeyer, S., Hunsmann, G. and Bodemer, W. (1996) Generation of monoclonal antibodies against human prion proteins in PrP<sup>0</sup>/0 mice. *Mol Med*, **2**, 725-734.
- Lasmezas, C.I. (2003) Putative functions of PrP(C). *Br Med Bull*, **66**, 61-70.
- Lasmezas, C.I., Deslys, J.P., Robain, O., Jaegly, A., Beringue, V., Peyrin, J.M., Fournier, J.G., Hauw, J.J., Rossier, J. and Dormont, D. (1997) Transmission of the BSE agent to mice in the absence of detectable abnormal prion protein. *Science*, **275**, 402-405.

- Leachman, S.A., Shylankevich, M., Slade, M.D., Levine, D., Sundaram, R.K., Xiao, W., Bryan, M., Zeltermann, D., Tiegelaar, R.E. and Brandsma, J.L. (2002) Ubiquitin-fused and/or multiple early genes from cottontail rabbit papillomavirus as DNA vaccines. *J Virol*, **76**, 7616-7624.
- Lee, H.S., Brown, P., Cervenakova, L., Garruto, R.M., Alpers, M.P., Gajdusek, D.C. and Goldfarb, L.G. (2001) Increased susceptibility to Kuru of carriers of the PRNP 129 methionine/methionine genotype. *J Infect Dis*, **183**, 192-196.
- Legname, G., Baskakov, I.V., Nguyen, H.O., Riesner, D., Cohen, F.E., DeArmond, S.J. and Prusiner, S.B. (2004) Synthetic mammalian prions. *Science*, **305**, 673-676.
- Lehmann, S. (2002) Metal ions and prion diseases. *Curr Opin Chem Biol*, **6**, 187-192.
- Leifert, J.A., Rodriguez-Carreno, M.P., Rodriguez, F. and Whitton, J.L. (2004) Targeting plasmid-encoded proteins to the antigen presentation pathways. *Immunol Rev*, **199**, 40-53.
- Leitner, W.W., Hwang, L.N., deVeer, M.J., Zhou, A., Silverman, R.H., Williams, B.R., Dubensky, T.W., Ying, H. and Restifo, N.P. (2003) Alphavirus-based DNA vaccine breaks immunological tolerance by activating innate antiviral pathways. *Nat Med*, **9**, 33-39.
- Lemaire-Vieille, C., Schulze, T., Podevin-Dimster, V., Follet, J., Bailly, Y., Blanquet-Grossard, F., Decavel, J.P., Heinen, E. and Cesbron, J.Y. (2000) Epithelial and endothelial expression of the green fluorescent protein reporter gene under the control of bovine prion protein (PrP) gene regulatory sequences in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 5422-5427.
- Li, R., Liu, D., Zanusso, G., Liu, T., Fayen, J.D., Huang, J.H., Petersen, R.B., Gambetti, P. and Sy, M.S. (2001) The expression and potential function of cellular prion protein in human lymphocytes. *Cell Immunol*, **207**, 49-58.
- Liberski, P.P., Barcikowska, M., Cervenakova, L., Bratosiewicz, J., Marczevska, M., Brown, P. and Gajdusek, D.C. (1998) A case of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease with a Gerstmann-Straussler-Scheinker phenotype but no alterations in the PRNP gene. *Acta Neuropathol (Berl)*, **96**, 425-430.
- Lin, K.Y., Guarnieri, F.G., Staveley-O'Carroll, K.F., Levitsky, H.I., August, J.T., Pardoll, D.M. and Wu, T.C. (1996) Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. *Cancer Res*, **56**, 21-26.
- Lipford, G.B., Heeg, K. and Wagner, H. (1998) Bacterial DNA as immune cell activator. *Trends Microbiol*, **6**, 496-500.
- Lode, H.N., Huebener, N., Zeng, Y., Fest, S., Weixler, S. and Gaedicke, G. (2004) DNA minigene vaccination for adjuvant neuroblastoma therapy. *Ann N Y Acad Sci*, **1028**, 113-121.

- Lugaresi, E., Montagna, P., Baruzzi, A., Cortelli, P., Tinuper, P., Zucconi, M., Gambetti, P.L. and Medori, R. (1986) [Familial insomnia with a malignant course: a new thalamic disease]. *Rev Neurol (Paris)*, **142**, 791-792.
- Luhr, K.M., Nordstrom, E.K., Low, P., Ljunggren, H.G., Taraboulos, A. and Kristensson, K. (2004) Scrapie protein degradation by cysteine proteases in CD11c+ dendritic cells and GT1-1 neuronal cells. *J Virol*, **78**, 4776-4782.
- Luhr, K.M., Wallin, R.P., Ljunggren, H.G., Low, P., Taraboulos, A. and Kristensson, K. (2002) Processing and degradation of exogenous prion protein by CD11c(+) myeloid dendritic cells in vitro. *J Virol*, **76**, 12259-12264.
- Mabbott, N.A., Bruce, M.E., Botto, M., Walport, M.J. and Pepys, M.B. (2001) Temporary depletion of complement component C3 or genetic deficiency of C1q significantly delays onset of scrapie. *Nat Med*, **7**, 485-487.
- Mabbott, N.A., Mackay, F., Minns, F. and Bruce, M.E. (2000a) Temporary inactivation of follicular dendritic cells delays neuroinvasion of scrapie. *Nat Med*, **6**, 719-720.
- Mabbott, N.A. and MacPherson, G.G. (2006) Prions and their lethal journey to the brain. *Nat Rev Microbiol*, **4**, 201-211.
- Mabbott, N.A., McGovern, G., Jeffrey, M. and Bruce, M.E. (2002) Temporary blockade of the tumor necrosis factor receptor signaling pathway impedes the spread of scrapie to the brain. *J Virol*, **76**, 5131-5139.
- Mabbott, N.A., Williams, A., Farquhar, C.F., Pasparakis, M., Kollias, G. and Bruce, M.E. (2000b) Tumor necrosis factor alpha-deficient, but not interleukin-6-deficient, mice resist peripheral infection with scrapie. *J Virol*, **74**, 3338-3344.
- Mabbott, N.A., Young, J., McConnell, I. and Bruce, M.E. (2003) Follicular dendritic cell dedifferentiation by treatment with an inhibitor of the lymphotoxin pathway dramatically reduces scrapie susceptibility. *J Virol*, **77**, 6845-6854.
- Mackay, F. and Browning, J.L. (1998) Turning off follicular dendritic cells. *Nature*, **395**, 26-27.
- Magri, G., Clerici, M., Dall'Ara, P., Biasin, M., Caramelli, M., Casalone, C., Giannino, M.L., Longhi, R., Piacentini, L., Della Bella, S., Gazzuola, P., Martino, P.A., Della Bella, S., Pollera, C., Puricelli, M., Servida, F., Crescio, I., Boasso, A., Ponti, W. and Poli, G. (2005) Decrease in pathology and progression of scrapie after immunisation with synthetic prion protein peptides in hamsters. *Vaccine*, **23**, 2862-2868.
- Maignien, T., Lasmezas, C.I., Beringue, V., Dormont, D. and Deslys, J.P. (1999) Pathogenesis of the oral route of infection of mice with scrapie and bovine spongiform encephalopathy agents. *J Gen Virol*, **80** ( Pt 11), 3035-3042.

- Maignien, T., Shakweh, M., Calvo, P., Marce, D., Sales, N., Fattal, E., Deslys, J.P., Couvreur, P. and Lasmezas, C.I. (2005) Role of gut macrophages in mice orally contaminated with scrapie or BSE. *Int J Pharm*, **298**, 293-304.
- Malcherek, G., Wirblich, C., Willcox, N., Rammensee, H.G., Trowsdale, J. and Melms, A. (1998) MHC class II-associated invariant chain peptide replacement by T cell epitopes: engineered invariant chain as a vehicle for directed and enhanced MHC class II antigen processing and presentation. *Eur J Immunol*, **28**, 1524-1533.
- Mallucci, G., Dickinson, A., Linehan, J., Klohn, P.C., Brandner, S. and Collinge, J. (2003) Depleting neuronal PrP in prion infection prevents disease and reverses spongiosis. *Science*, **302**, 871-874.
- Mandel, T.E., Phipps, R.P., Abbot, A. and Tew, J.G. (1980) The follicular dendritic cell: long term antigen retention during immunity. *Immunol Rev*, **53**, 29-59.
- Manson, J., West, J.D., Thomson, V., McBride, P., Kaufman, M.H. and Hope, J. (1992) The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis? *Development*, **115**, 117-122.
- Manson, J.C., Clarke, A.R., Hooper, M.L., Aitchison, L., McConnell, I. and Hope, J. (1994) 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Mol Neurobiol*, **8**, 121-127.
- Masel, J. and Jansen, V.A. (2001) The measured level of prion infectivity varies in a predictable way according to the aggregation state of the infectious agent. *Biochim Biophys Acta*, **1535**, 164-173.
- Masel, J., Jansen, V.A. and Nowak, M.A. (1999) Quantifying the kinetic parameters of prion replication. *Biophys Chem*, **77**, 139-152.
- Mastrianni, J.A., Curtis, M.T., Oberholtzer, J.C., Da Costa, M.M., DeArmond, S., Prusiner, S.B. and Garbern, J.Y. (1995) Prion disease (PrP-A117V) presenting with ataxia instead of dementia. *Neurology*, **45**, 2042-2050.
- Mattei, V., Garofalo, T., Misasi, R., Circella, A., Manganelli, V., Lucania, G., Pavan, A. and Sorice, M. (2004) Prion protein is a component of the multimolecular signaling complex involved in T cell activation. *FEBS Lett*, **560**, 14-18.
- Maxam, A.M. and Gilbert, W. (1977) A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 560-564.
- McBride, P.A. and Beekes, M. (1999) Pathological PrP is abundant in sympathetic and sensory ganglia of hamsters fed with scrapie. *Neurosci Lett*, **265**, 135-138.
- McBride, P.A., Eikelenboom, P., Kraal, G., Fraser, H. and Bruce, M.E. (1992) PrP protein is associated with follicular dendritic cells of spleens and lymph nodes in uninfected and scrapie-infected mice. *J Pathol*, **168**, 413-418.

- McBride, P.A., Schulz-Schaeffer, W.J., Donaldson, M., Bruce, M., Diringer, H., Kretzschmar, H.A. and Beekes, M. (2001) Early spread of scrapie from the gastrointestinal tract to the central nervous system involves autonomic fibers of the splanchnic and vagus nerves. *J Virol*, **75**, 9320-9327.
- McBride, S.M. (2005) Prion protein: a pattern recognition receptor for viral components and uric acid responsible for the induction of innate and adaptive immunity. *Med Hypotheses*, **65**, 570-577.
- Mead, S., Stumpf, M.P., Whitfield, J., Beck, J.A., Poulter, M., Campbell, T., Uphill, J.B., Goldstein, D., Alpers, M., Fisher, E.M. and Collinge, J. (2003) Balancing selection at the prion protein gene consistent with prehistoric kurulike epidemics. *Science*, **300**, 640-643.
- Medawar, P.B. (1953) Biological problems of skin surgery. *J Int Chir*, **13**, 385-391; includes translations.
- Medori, R., Tritschler, H.J., LeBlanc, A., Villare, F., Manetto, V., Chen, H.Y., Xue, R., Leal, S., Montagna, P., Cortelli, P. and et al. (1992) Fatal familial insomnia, a prion disease with a mutation at codon 178 of the prion protein gene. *N Engl J Med*, **326**, 444-449.
- Meier, P., Genoud, N., Prinz, M., Maissen, M., Rulicke, T., Zurbriggen, A., Raeber, A.J. and Aguzzi, A. (2003) Soluble dimeric prion protein binds PrP(Sc) in vivo and antagonizes prion disease. *Cell*, **113**, 49-60.
- Meyer-Luehmann, M., Coomaraswamy, J., Bolmont, T., Kaeser, S., Schaefer, C., Kilger, E., Neuenschwander, A., Abramowski, D., Frey, P., Jaton, A.L., Vigouret, J.M., Paganetti, P., Walsh, D.M., Mathews, P.M., Ghiso, J., Staufenbiel, M., Walker, L.C. and Jucker, M. (2006) Exogenous induction of cerebral beta-amyloidogenesis is governed by agent and host. *Science*, **313**, 1781-1784.
- Meyer, R.K., McKinley, M.P., Bowman, K.A., Braunfeld, M.B., Barry, R.A. and Prusiner, S.B. (1986) Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 2310-2314.
- Mishra, R.S., Basu, S., Gu, Y., Luo, X., Zou, W.Q., Mishra, R., Li, R., Chen, S.G., Gambetti, P., Fujioka, H. and Singh, N. (2004) Protease-resistant human prion protein and ferritin are cotransported across Caco-2 epithelial cells: implications for species barrier in prion uptake from the intestine. *J Neurosci*, **24**, 11280-11290.
- Mohan, J., Bruce, M.E. and Mabbott, N.A. (2005a) Follicular dendritic cell dedifferentiation reduces scrapie susceptibility following inoculation via the skin. *Immunology*, **114**, 225-234.
- Mohan, J., Bruce, M.E. and Mabbott, N.A. (2005b) Neuroinvasion by scrapie following inoculation via the skin is independent of migratory Langerhans cells. *J Virol*, **79**, 1888-1897.

- Mohan, J., Hopkins, J. and Mabbott, N.A. (2005c) Skin-derived dendritic cells acquire and degrade the scrapie agent following in vitro exposure. *Immunology*, **116**, 122-133.
- Montrasio, F., Frigg, R., Glatzel, M., Klein, M.A., Mackay, F., Aguzzi, A. and Weissmann, C. (2000) Impaired prion replication in spleens of mice lacking functional follicular dendritic cells. *Science*, **288**, 1257-1259.
- Moore, M.W., Carbone, F.R. and Bevan, M.J. (1988) Introduction of soluble protein into the class I pathway of antigen processing and presentation. *Cell*, **54**, 777-785.
- Moreno, J., Vignali, D.A., Nadimi, F., Fuchs, S., Adorini, L. and Hammerling, G.J. (1991) Processing of an endogenous protein can generate MHC class II-restricted T cell determinants distinct from those derived from exogenous antigen. *J Immunol*, **147**, 3306-3313.
- Morgan, D., Diamond, D.M., Gottschall, P.E., Ugen, K.E., Dickey, C., Hardy, J., Duff, K., Jantzen, P., DiCarlo, G., Wilcock, D., Connor, K., Hatcher, J., Hope, C., Gordon, M. and Arendash, G.W. (2000) A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature*, **408**, 982-985.
- Muller, S., Kehm, R., Handermann, M., Jakob, N.J., Bahr, U., Schroder, B. and Darai, G. (2005) Testing the possibility to protect bovine PrPC transgenic Swiss mice against bovine PrPSc infection by DNA vaccination using recombinant plasmid vectors harboring and expressing the complete or partial cDNA sequences of bovine PrPC. *Virus Genes*, **30**, 279-296.
- Nagata, T., Aoshi, T., Suzuki, M., Uchijima, M., Kim, Y.H., Yang, Z. and Koide, Y. (2002) Induction of protective immunity to *Listeria monocytogenes* by immunization with plasmid DNA expressing a helper T-cell epitope that replaces the class II-associated invariant chain peptide of the invariant chain. *Infect Immun*, **70**, 2676-2680.
- Nagata, T., Aoshi, T., Uchijima, M., Suzuki, M. and Koide, Y. (2004) Cytotoxic T-lymphocyte-, and helper T-lymphocyte-oriented DNA vaccination. *DNA Cell Biol*, **23**, 93-106.
- Nagata, T., Higashi, T., Aoshi, T., Suzuki, M., Uchijima, M. and Koide, Y. (2001) Immunization with plasmid DNA encoding MHC class II binding peptide/CLIP-replaced invariant chain (Ii) induces specific helper T cells in vivo: the assessment of Ii p31 and p41 isoforms as vehicles for immunization. *Vaccine*, **20**, 105-114.
- Negro, A., Ballarin, C., Bertoli, A., Massimino, M.L. and Sorgato, M.C. (2001) The metabolism and imaging in live cells of the bovine prion protein in its native form or carrying single amino acid substitutions. *Mol Cell Neurosci*, **17**, 521-538.

- Neutra, M.R., Frey, A. and Kraehenbuhl, J.P. (1996) Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization. *Cell*, **86**, 345-348.
- Nguyen, D.G., Booth, A., Gould, S.J. and Hildreth, J.E. (2003) Evidence that HIV budding in primary macrophages occurs through the exosome release pathway. *J Biol Chem*, **278**, 52347-52354.
- Nicoll, J.A., Wilkinson, D., Holmes, C., Steart, P., Markham, H. and Weller, R.O. (2003) Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report. *Nat Med*, **9**, 448-452.
- Nikles, D., Bach, P., Boller, K., Merten, C.A., Montrasio, F., Heppner, F.L., Aguzzi, A., Cichutek, K., Kalinke, U. and Buchholz, C.J. (2005) Circumventing tolerance to the prion protein (PrP): vaccination with PrP-displaying retrovirus particles induces humoral immune responses against the native form of cellular PrP. *J Virol*, **79**, 4033-4042.
- Nordstrom, E.K., Luhr, K.M., Ibanez, C. and Kristensson, K. (2005) Inhibitors of the mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 signaling pathway clear prion-infected cells from PrPSc. *J Neurosci*, **25**, 8451-8456.
- Orme, I.M. (2006) Preclinical testing of new vaccines for tuberculosis: a comprehensive review. *Vaccine*, **24**, 2-19.
- Oxenius, A., Bachmann, M.F., Mathis, D., Benoist, C., Zinkernagel, R.M. and Hengartner, H. (1997) Functional in vivo MHC class II loading by endogenously synthesized glycoprotein during viral infection. *J Immunol*, **158**, 5717-5726.
- Paillot, R., Hannant, D., Kydd, J.H. and Daly, J.M. (2006) Vaccination against equine influenza: quid novi? *Vaccine*, **24**, 4047-4061.
- Palmer, M.S., Dryden, A.J., Hughes, J.T. and Collinge, J. (1991) Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Nature*, **352**, 340-342.
- Pan, K.M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R.J., Cohen, F.E. and et al. (1993) Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 10962-10966.
- Pardoll, D. (2003) Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annu Rev Immunol*, **21**, 807-839.
- Parra-Lopez, C.A., Lindner, R., Vidavsky, I., Gross, M. and Unanue, E.R. (1997) Presentation on class II MHC molecules of endogenous lysozyme targeted to the endocytic pathway. *J Immunol*, **158**, 2670-2679.
- Peretz, D., Williamson, R.A., Kaneko, K., Vergara, J., Leclerc, E., Schmitt-Ulms, G., Mehlhorn, I.R., Legname, G., Wormald, M.R., Rudd, P.M., Dwek, R.A., Burton,



- D.R. and Prusiner, S.B. (2001) Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity. *Nature*, **412**, 739-743.
- Perrier, V., Kaneko, K., Safar, J., Vergara, J., Tremblay, P., DeArmond, S.J., Cohen, F.E., Prusiner, S.B. and Wallace, A.C. (2002) Dominant-negative inhibition of prion replication in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 13079-13084.
- Perrier, V., Solassol, J., Crozet, C., Frobert, Y., Mourton-Gilles, C., Grassi, J. and Lehmann, S. (2004) Anti-PrP antibodies block PrPSc replication in prion-infected cell cultures by accelerating PrPC degradation. *J Neurochem*, **89**, 454-463.
- Pescovitz, M.D., Lunney, J.K. and Sachs, D.H. (1985) Murine anti-swine T4 and T8 monoclonal antibodies: distribution and effects on proliferative and cytotoxic T cells. *J Immunol*, **134**, 37-44.
- Petersen, R.B., Parchi, P., Richardson, S.L., Urig, C.B. and Gambetti, P. (1996) Effect of the D178N mutation and the codon 129 polymorphism on the metabolism of the prion protein. *J Biol Chem*, **271**, 12661-12668.
- Pisetsky, D.S. (1996) Immune activation by bacterial DNA: a new genetic code. *Immunity*, **5**, 303-310.
- Pocchiari, M., Schmittinger, S. and Masullo, C. (1987) Amphotericin B delays the incubation period of scrapie in intracerebrally inoculated hamsters. *J Gen Virol*, **68** ( Pt 1), 219-223.
- Polymenidou, M., Heppner, F.L., Pelliccioli, E.C., Urich, E., Miele, G., Braun, N., Wopfner, F., Schatzl, H.M., Becher, B. and Aguzzi, A. (2004) Humoral immune response to native eukaryotic prion protein correlates with anti-prion protection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101 Suppl 2**, 14670-14676.
- Porter, D.D., Porter, H.G. and Cox, N.A. (1973) Failure to demonstrate a humoral immune response to scrapie infection in mice. *J Immunol*, **111**, 1407-1410.
- Prinz, M., Heikenwalder, M., Junt, T., Schwarz, P., Glatzel, M., Heppner, F.L., Fu, Y.X., Lipp, M. and Aguzzi, A. (2003a) Positioning of follicular dendritic cells within the spleen controls prion neuroinvasion. *Nature*, **425**, 957-962.
- Prinz, M., Huber, G., Macpherson, A.J., Heppner, F.L., Glatzel, M., Eugster, H.P., Wagner, N. and Aguzzi, A. (2003b) Oral prion infection requires normal numbers of Peyer's patches but not of enteric lymphocytes. *Am J Pathol*, **162**, 1103-1111.
- Prinz, M., Montrasio, F., Klein, M.A., Schwarz, P., Priller, J., Odermatt, B., Pfeffer, K. and Aguzzi, A. (2002) Lymph nodal prion replication and neuroinvasion in mice devoid of follicular dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 919-924.

- Priola, S.A., Raines, A. and Caughey, W.S. (2000) Porphyrin and phthalocyanine antiscrapie compounds. *Science*, **287**, 1503-1506.
- Proske, D., Gilch, S., Wopfner, F., Schatzl, H.M., Winnacker, E.L. and Famulok, M. (2002) Prion-protein-specific aptamer reduces PrP<sup>Sc</sup> formation. *Chembiochem*, **3**, 717-725.
- Prud'homme, G.J. (2005) DNA vaccination against tumors. *J Gene Med*, **7**, 3-17.
- Prusiner, S.B. (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, **216**, 136-144.
- Prusiner, S.B. (1991) Molecular biology of prion diseases. *Science*, **252**, 1515-1522.
- Prusiner, S.B. (1993) Genetic and infectious prion diseases. *Arch Neurol*, **50**, 1129-1153.
- Prusiner, S.B. (1997) Prion diseases and the BSE crisis. *Science*, **278**, 245-251.
- Prusiner, S.B. (2001) Shattuck lecture--neurodegenerative diseases and prions. *N Engl J Med*, **344**, 1516-1526.
- Prusiner, S.B., McKinley, M.P., Bowman, K.A., Bolton, D.C., Bendheim, P.E., Groth, D.F. and Glenner, G.G. (1983) Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell*, **35**, 349-358.
- Prusiner, S.B., Scott, M., Foster, D., Pan, K.M., Groth, D., Mirenda, C., Torchia, M., Yang, S.L., Serban, D., Carlson, G.A. and et al. (1990) Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell*, **63**, 673-686.
- Prusiner, S.B., Scott, M.R., DeArmond, S.J. and Cohen, F.E. (1998) Prion protein biology. *Cell*, **93**, 337-348.
- Rapoport, T.A. (1992) Transport of proteins across the endoplasmic reticulum membrane. *Science*, **258**, 931-936.
- Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J.P. and Ricciardi-Castagnoli, P. (2001) Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol*, **2**, 361-367.
- Rhie, A., Kirby, L., Sayer, N., Wellesley, R., Disterer, P., Sylvester, I., Gill, A., Hope, J., James, W. and Tahiri-Alaoui, A. (2003) Characterization of 2'-fluoro-RNA aptamers that bind preferentially to disease-associated conformations of prion protein and inhibit conversion. *J Biol Chem*, **278**, 39697-39705.
- Riek, R., Wider, G., Billeter, M., Hornemann, S., Glockshuber, R. and Wuthrich, K. (1998) Prion protein NMR structure and familial human spongiform encephalopathies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 11667-11672.

- Rock, K.L. and Clark, K. (1996) Analysis of the role of MHC class II presentation in the stimulation of cytotoxic T lymphocytes by antigens targeted into the exogenous antigen-MHC class I presentation pathway. *J Immunol*, **156**, 3721-3726.
- Rodriguez, F., An, L.L., Harkins, S., Zhang, J., Yokoyama, M., Widera, G., Fuller, J.T., Kincaid, C., Campbell, I.L. and Whitton, J.L. (1998) DNA immunization with minigenes: low frequency of memory cytotoxic T lymphocytes and inefficient antiviral protection are rectified by ubiquitination. *J Virol*, **72**, 5174-5181.
- Rodriguez, F., Harkins, S., Redwine, J.M., de Pereda, J.M. and Whitton, J.L. (2001) CD4(+) T cells induced by a DNA vaccine: immunological consequences of epitope-specific lysosomal targeting. *J Virol*, **75**, 10421-10430.
- Rodriguez, F., Harkins, S., Slifka, M.K. and Whitton, J.L. (2002) Immunodominance in virus-induced CD8(+) T-cell responses is dramatically modified by DNA immunization and is regulated by gamma interferon. *J Virol*, **76**, 4251-4259.
- Rodriguez, F. and Whitton, J.L. (2000) Enhancing DNA immunization. *Virology*, **268**, 233-238.
- Rodriguez, F., Zhang, J. and Whitton, J.L. (1997) DNA immunization: ubiquitination of a viral protein enhances cytotoxic T-lymphocyte induction and antiviral protection but abrogates antibody induction. *J Virol*, **71**, 8497-8503.
- Rosset, M.B., Ballerini, C., Gregoire, S., Metharom, P., Carnaud, C. and Aucouturier, P. (2004) Breaking immune tolerance to the prion protein using prion protein peptides plus oligodeoxynucleotide-CpG in mice. *J Immunol*, **172**, 5168-5174.
- Rowell, J.F., Ruff, A.L., Guarnieri, F.G., Staveley-O'Carroll, K., Lin, X., Tang, J., August, J.T. and Siliciano, R.F. (1995) Lysosome-associated membrane protein-1-mediated targeting of the HIV-1 envelope protein to an endosomal/lysosomal compartment enhances its presentation to MHC class II-restricted T cells. *J Immunol*, **155**, 1818-1828.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning - A Laboratory Manual, 2nd Edition*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Sanderson, S., Frauwirth, K. and Shastri, N. (1995) Expression of endogenous peptide-major histocompatibility complex class II complexes derived from invariant chain-antigen fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 7217-7221.
- Sato, Y., Roman, M., Tighe, H., Lee, D., Corr, M., Nguyen, M.D., Silverman, G., Lotz, M., Carson, D.A. and Raz, E. (1996) Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. *Science*, **273**, 352-354.
- Schwarz, A., Kratke, O., Burwinkel, M., Riemer, C., Schultz, J., Henklein, P., Bamm, T. and Baier, M. (2003) Immunisation with a synthetic prion protein-derived peptide prolongs survival times of mice orally exposed to the scrapie agent. *Neurosci Lett*, **350**, 187-189.

- Sethi, S., Lipford, G., Wagner, H. and Kretzschmar, H. (2002) Postexposure prophylaxis against prion disease with a stimulator of innate immunity. *Lancet*, **360**, 229-230.
- Shaked, G.M., Engelstein, R., Avraham, I., Kahana, E. and Gabizon, R. (2003) Dimethyl sulfoxide delays PrP<sup>sc</sup> accumulation and disease symptoms in prion-infected hamsters. *Brain Res*, **983**, 137-143.
- Shedlock, D.J. and Weiner, D.B. (2000) DNA vaccination: antigen presentation and the induction of immunity. *J Leukoc Biol*, **68**, 793-806.
- Shi, X.J., Wang, B. and Wang, M. (2007) Immune enhancing effects of recombinant bovine IL-18 on foot-and-mouth disease vaccination in mice model. *Vaccine*, **25**, 1257-1264.
- Shibuya, S., Higuchi, J., Shin, R.W., Tateishi, J. and Kitamoto, T. (1998) Protective prion protein polymorphisms against sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet*, **351**, 419.
- Shortman, K. and Liu, Y.J. (2002) Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol*, **2**, 151-161.
- Sigurdson, C.J., Spraker, T.R., Miller, M.W., Oesch, B. and Hoover, E.A. (2001) PrP(CWD) in the myenteric plexus, vagosympathetic trunk and endocrine glands of deer with chronic wasting disease. *J Gen Virol*, **82**, 2327-2334.
- Sigurdson, C.J., Williams, E.S., Miller, M.W., Spraker, T.R., O'Rourke, K.I. and Hoover, E.A. (1999) Oral transmission and early lymphoid tropism of chronic wasting disease PrPres in mule deer fawns (*Odocoileus hemionus*). *J Gen Virol*, **80** ( Pt 10), 2757-2764.
- Sigurdsson, B., Palsson, P.A. and Tryggvaddottir, A. (1953) Transmission experiments with maedi. *J Infect Dis*, **93**, 166-175.
- Sigurdsson, E.M., Brown, D.R., Daniels, M., Kascsak, R.J., Kascsak, R., Carp, R., Meeker, H.C., Frangione, B. and Wisniewski, T. (2002) Immunization delays the onset of prion disease in mice. *Am J Pathol*, **161**, 13-17.
- Sigurdsson, E.M., Sy, M.S., Li, R., Scholtzova, H., Kascsak, R.J., Kascsak, R., Carp, R., Meeker, H.C., Frangione, B. and Wisniewski, T. (2003) Anti-prion antibodies for prophylaxis following prion exposure in mice. *Neurosci Lett*, **336**, 185-187.
- Singh, N., Zanusso, G., Chen, S.G., Fujioka, H., Richardson, S., Gambetti, P. and Petersen, R.B. (1997) Prion protein aggregation reverted by low temperature in transfected cells carrying a prion protein gene mutation. *J Biol Chem*, **272**, 28461-28470.
- Solfrosi, L., Criado, J.R., McGavern, D.B., Wirz, S., Sanchez-Alavez, M., Sugama, S., DeGiorgio, L.A., Volpe, B.T., Wiseman, E., Abalos, G., Masliah, E., Gilden, D.,

- Oldstone, M.B., Conti, B. and Williamson, R.A. (2004) Cross-linking cellular prion protein triggers neuronal apoptosis in vivo. *Science*, **303**, 1514-1516.
- Soto, C., Anderes, L., Suardi, S., Cardone, F., Castilla, J., Frossard, M.J., Peano, S., Saa, P., Limido, L., Carbonatto, M., Ironside, J., Torres, J.M., Pocchiari, M. and Tagliavini, F. (2005) Pre-symptomatic detection of prions by cyclic amplification of protein misfolding. *FEBS Lett*, **579**, 638-642.
- Soto, C., Kascsak, R.J., Saborio, G.P., Aucouturier, P., Wisniewski, T., Prelli, F., Kascsak, R., Mendez, E., Harris, D.A., Ironside, J., Tagliavini, F., Carp, R.I. and Frangione, B. (2000) Reversion of prion protein conformational changes by synthetic beta-sheet breaker peptides. *Lancet*, **355**, 192-197.
- Souan, L., Tal, Y., Felling, Y., Cohen, I.R., Taraboulos, A. and Mor, F. (2001) Modulation of proteinase-K resistant prion protein by prion peptide immunization. *Eur J Immunol*, **31**, 2338-2346.
- Sparrer, H.E., Santoso, A., Szoka, F.C., Jr. and Weissman, J.S. (2000) Evidence for the prion hypothesis: induction of the yeast [PSI<sup>+</sup>] factor by in vitro- converted Sup35 protein. *Science*, **289**, 595-599.
- Stahl, N., Borchelt, D.R., Hsiao, K. and Prusiner, S.B. (1987) Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell*, **51**, 229-240.
- Suhrbier, A. (1997) Multi-epitope DNA vaccines. *Immunol Cell Biol*, **75**, 402-408.
- Supattapone, S., Wille, H., Uyechi, L., Safar, J., Tremblay, P., Szoka, F.C., Cohen, F.E., Prusiner, S.B. and Scott, M.R. (2001) Branched polyamines cure prion-infected neuroblastoma cells. *J Virol*, **75**, 3453-3461.
- Tagliavini, F., McArthur, R.A., Canciani, B., Giaccone, G., Porro, M., Bugiani, M., Lievens, P.M., Bugiani, O., Peri, E., Dall'Ara, P., Rocchi, M., Poli, G., Forloni, G., Bandiera, T., Varasi, M., Suarato, A., Cassutti, P., Cervini, M.A., Lansen, J., Salmona, M. and Post, C. (1997) Effectiveness of anthracycline against experimental prion disease in Syrian hamsters. *Science*, **276**, 1119-1122.
- Tal, Y., Souan, L., Cohen, I.R., Meiner, Z., Taraboulos, A. and Mor, F. (2003) Complete Freund's adjuvant immunization prolongs survival in experimental prion disease in mice. *J Neurosci Res*, **71**, 286-290.
- Taraboulos, A., Raeber, A.J., Borchelt, D.R., Serban, D. and Prusiner, S.B. (1992) Synthesis and trafficking of prion proteins in cultured cells. *Mol Biol Cell*, **3**, 851-863.
- Taylor, D.M., McConnell, I. and Fraser, H. (1996) Scrapie infection can be established readily through skin scarification in immunocompetent but not immunodeficient mice. *J Gen Virol*, **77** ( Pt 7), 1595-1599.

- Telling, G.C., Tremblay, P., Torchia, M., Dearmond, S.J., Cohen, F.E. and Prusiner, S.B. (1997) N-terminally tagged prion protein supports prion propagation in transgenic mice. *Protein Sci*, **6**, 825-833.
- Terry, L.A., Marsh, S., Ryder, S.J., Hawkins, S.A., Wells, G.A. and Spencer, Y.I. (2003) Detection of disease-specific PrP in the distal ileum of cattle exposed orally to the agent of bovine spongiform encephalopathy. *Vet Rec*, **152**, 387-392.
- Thery, C., Zitvogel, L. and Amigorena, S. (2002) Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol*, **2**, 569-579.
- Thomson, S.A., Burrows, S.R., Misko, I.S., Moss, D.J., Coupar, B.E. and Khanna, R. (1998a) Targeting a polyepitope protein incorporating multiple class II-restricted viral epitopes to the secretory/endocytic pathway facilitates immune recognition by CD4+ cytotoxic T lymphocytes: a novel approach to vaccine design. *J Virol*, **72**, 2246-2252.
- Thomson, S.A., Elliott, S.L., Sherritt, M.A., Sproat, K.W., Coupar, B.E., Scalzo, A.A., Forbes, C.A., Ladhams, A.M., Mo, X.Y., Tripp, R.A., Doherty, P.C., Moss, D.J. and Suhrbier, A. (1996) Recombinant polyepitope vaccines for the delivery of multiple CD8 cytotoxic T cell epitopes. *J Immunol*, **157**, 822-826.
- Thomson, S.A., Khanna, R., Gardner, J., Burrows, S.R., Coupar, B., Moss, D.J. and Suhrbier, A. (1995) Minimal epitopes expressed in a recombinant polyepitope protein are processed and presented to CD8+ cytotoxic T cells: implications for vaccine design. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 5845-5849.
- Thomson, S.A., Sherritt, M.A., Medveczky, J., Elliott, S.L., Moss, D.J., Fernando, G.J., Brown, L.E. and Suhrbier, A. (1998b) Delivery of multiple CD8 cytotoxic T cell epitopes by DNA vaccination. *J Immunol*, **160**, 1717-1723.
- Tian, G., Yi, J.L. and Xiong, P. (2004) Antitumor immunopreventive effect in mice induced by DNA vaccine encoding a fusion protein of alpha-fetoprotein and CTLA4. *World J Gastroenterol*, **10**, 200-204.
- Tobery, T. and Siliciano, R.F. (1999) Cutting edge: induction of enhanced CTL-dependent protective immunity in vivo by N-end rule targeting of a model tumor antigen. *J Immunol*, **162**, 639-642.
- Tobery, T.W. and Siliciano, R.F. (1997) Targeting of HIV-1 antigens for rapid intracellular degradation enhances cytotoxic T lymphocyte (CTL) recognition and the induction of de novo CTL responses in vivo after immunization. *J Exp Med*, **185**, 909-920.
- Trevitt, C.R. and Collinge, J. (2006) A systematic review of prion therapeutics in experimental models. *Brain*, **129**, 2241-2265.
- van Bakkum, J.G. (1969) Correlation between serum antibody level and protection against challenge with FMD. *Session of the Research group of the standing*

*Technological Committee of the European Commission for the control of foot-and-mouth disease.* . FAO, Brescia, Italy.

- van Bergen, J., Camps, M., Offringa, R., Melief, C.J., Ossendorp, F. and Koning, F. (2000) Superior tumor protection induced by a cellular vaccine carrying a tumor-specific T helper epitope by genetic exchange of the class II-associated invariant chain peptide. *Cancer Res*, **60**, 6427-6433.
- van Keulen, L.J., Schreuder, B.E., Meloen, R.H., Mooij-Harkes, G., Vromans, M.E. and Langeveld, J.P. (1996) Immunohistochemical detection of prion protein in lymphoid tissues of sheep with natural scrapie. *J Clin Microbiol*, **34**, 1228-1231.
- van Keulen, L.J., Schreuder, B.E., Vromans, M.E., Langeveld, J.P. and Smits, M.A. (2000) Pathogenesis of natural scrapie in sheep. *Arch Virol Suppl*, 57-71.
- van Tienhoven, E.A., ten Brink, C.T., van Bergen, J., Koning, F., van Eden, W. and Broeren, C.P. (2001) Induction of antigen specific CD4+ T cell responses by invariant chain based DNA vaccines. *Vaccine*, **19**, 1515-1519.
- Varshavsky, A. (1996) The N-end rule: functions, mysteries, uses. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**, 12142-12149.
- Vega, M.A., Rodriguez, F., Segui, B., Cales, C., Alcalde, J. and Sandoval, I.V. (1991) Targeting of lysosomal integral membrane protein LIMP II. The tyrosine-lacking carboxyl cytoplasmic tail of LIMP II is sufficient for direct targeting to lysosomes. *J Biol Chem*, **266**, 16269-16272.
- Wadsworth, J.D., Hill, A.F., Beck, J.A. and Collinge, J. (2003) Molecular and clinical classification of human prion disease. *Br Med Bull*, **66**, 241-254.
- Wadsworth, J.D., Joiner, S., Hill, A.F., Campbell, T.A., Desbruslais, M., Luthert, P.J. and Collinge, J. (2001) Tissue distribution of protease resistant prion protein in variant Creutzfeldt-Jakob disease using a highly sensitive immunoblotting assay. *Lancet*, **358**, 171-180.
- Watts, C. (1997) Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annu Rev Immunol*, **15**, 821-850.
- Wegner, C., Romer, A., Schmalzbauer, R., Lorenz, H., Windl, O. and Kretzschmar, H.A. (2002) Mutant prion protein acquires resistance to protease in mouse neuroblastoma cells. *J Gen Virol*, **83**, 1237-1245.
- Wei, M.L. and Cresswell, P. (1992) HLA-A2 molecules in an antigen-processing mutant cell contain signal sequence-derived peptides. *Nature*, **356**, 443-446.
- Welker, E., Raymond, L.D., Scheraga, H.A. and Caughey, B. (2002) Intramolecular versus intermolecular disulfide bonds in prion proteins. *J Biol Chem*, **277**, 33477-33481.

- Wherry, E.J., Puorro, K.A., Porgador, A. and Eisenlohr, L.C. (1999) The induction of virus-specific CTL as a function of increasing epitope expression: responses rise steadily until excessively high levels of epitope are attained. *J Immunol*, **163**, 3735-3745.
- White, A.R., Enever, P., Tayebi, M., Mushens, R., Linehan, J., Brandner, S., Anstee, D., Collinge, J. and Hawke, S. (2003) Monoclonal antibodies inhibit prion replication and delay the development of prion disease. *Nature*, **422**, 80-83.
- Whitton, J.L., Rodriguez, F., Zhang, J. and Hassett, D.E. (1999) DNA immunization: mechanistic studies. *Vaccine*, **17**, 1612-1619.
- Whitton, J.L., Sheng, N., Oldstone, M.B. and McKee, T.A. (1993) A "string-of-beads" vaccine, comprising linked minigenes, confers protection from lethal-dose virus challenge. *J Virol*, **67**, 348-352.
- Whitton, J.L., Tishon, A., Lewicki, H., Gebhard, J., Cook, T., Salvato, M., Joly, E. and Oldstone, M.B. (1989) Molecular analyses of a five-amino-acid cytotoxic T-lymphocyte (CTL) epitope: an immunodominant region which induces nonreciprocal CTL cross-reactivity. *J Virol*, **63**, 4303-4310.
- Wickner, S., Maurizi, M.R. and Gottesman, S. (1999) Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science*, **286**, 1888-1893.
- Wille, H., Michelitsch, M.D., Guenebaut, V., Supattapone, S., Serban, A., Cohen, F.E., Agard, D.A. and Prusiner, S.B. (2002) Structural studies of the scrapie prion protein by electron crystallography. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 3563-3568.
- Williamson, R.A., Peretz, D., Smorodinsky, N., Bastidas, R., Serban, H., Mehlhorn, I., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B. and Burton, D.R. (1996) Circumventing tolerance to generate autologous monoclonal antibodies to the prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 7279-7282.
- Woodberry, T., Gardner, J., Mateo, L., Eisen, D., Medveczky, J., Ramshaw, I.A., Thomson, S.A., Ffrench, R.A., Elliott, S.L., Firat, H., Lemonnier, F.A. and Suhrbier, A. (1999) Immunogenicity of a human immunodeficiency virus (HIV) polytope vaccine containing multiple HLA A2 HIV CD8(+) cytotoxic T-cell epitopes. *J Virol*, **73**, 5320-5325.
- Worthington, M. (1972) Interferon system in mice infected with the scrapie agent. *Infect Immun*, **6**, 643-645.
- Wu, T.C., Guarnieri, F.G., Staveley-O'Carroll, K.F., Viscidi, R.P., Levitsky, H.I., Hedrick, L., Cho, K.R., August, J.T. and Pardoll, D.M. (1995) Engineering an intracellular pathway for major histocompatibility complex class II presentation of antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 11671-11675.
- Wykes, M., Pombo, A., Jenkins, C. and MacPherson, G.G. (1998) Dendritic cells interact directly with naive B lymphocytes to transfer antigen and initiate class switching in a primary T-dependent response. *J Immunol*, **161**, 1313-1319.



- Xiang, R., Lode, H.N., Chao, T.H., Ruehlmann, J.M., Dolman, C.S., Rodriguez, F., Whitton, J.L., Overwijk, W.W., Restifo, N.P. and Reisfeld, R.A. (2000) An autologous oral DNA vaccine protects against murine melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 5492-5497.
- Yamada, M., Itoh, Y., Fujigasaki, H., Naruse, S., Kaneko, K., Kitamoto, T., Tateishi, J., Otomo, E., Hayakawa, M., Tanaka, J. and et al. (1993) A missense mutation at codon 105 with codon 129 polymorphism of the prion protein gene in a new variant of Gerstmann-Straussler-Scheinker disease. *Neurology*, **43**, 2723-2724.
- Yoshida, K., van den Berg, T.K. and Dijkstra, C.D. (1993) Two functionally different follicular dendritic cells in secondary lymphoid follicles of mouse spleen, as revealed by CR1/2 and FcR gamma II-mediated immune-complex trapping. *Immunology*, **80**, 34-39.
- Young, H.A. and Ortaldo, J. (2006) Cytokines as critical co-stimulatory molecules in modulating the immune response of natural killer cells. *Cell Res*, **16**, 20-24.
- Yu, P., Wang, Y., Chin, R.K., Martinez-Pomares, L., Gordon, S., Kosco-Vibois, M.H., Cyster, J. and Fu, Y.X. (2002) B cells control the migration of a subset of dendritic cells into B cell follicles via CXC chemokine ligand 13 in a lymphotoxin-dependent fashion. *J Immunol*, **168**, 5117-5123.
- Yu, Z. and Restifo, N.P. (2002) Cancer vaccines: progress reveals new complexities. *J Clin Invest*, **110**, 289-294.
- Zanusso, G., Petersen, R.B., Jin, T., Jing, Y., Kanoush, R., Ferrari, S., Gambetti, P. and Singh, N. (1999) Proteasomal degradation and N-terminal protease resistance of the codon 145 mutant prion protein. *J Biol Chem*, **274**, 23396-23404.
- Zarranz, J.J. (2006) [Prion diseases]. *Neurologia*, **21**, 395-399.
- Zhang, Y., Swietnicki, W., Zagorski, M.G., Surewicz, W.K. and Sonnichsen, F.D. (2000) Solution structure of the E200K variant of human prion protein. Implications for the mechanism of pathogenesis in familial prion diseases. *J Biol Chem*, **275**, 33650-33654.
- Ziegler, J., Sticht, H., Marx, U.C., Muller, W., Rosch, P. and Schwarzinger, S. (2003) CD and NMR studies of prion protein (PrP) helix 1. Novel implications for its role in the PrPC-->PrPSc conversion process. *J Biol Chem*, **278**, 50175-50181.
- Zinkernagel, R.M. (2002) On cross-priming of MHC class I-specific CTL: rule or exception? *Eur J Immunol*, **32**, 2385-2392.

## 8. ANEXO

*Resultados numéricos de los resultados presentados en el trabajo.*



**Figura 12:** Resultados del ELISA utilizando los sueros obtenidos tras inmunizar ratones 129P2/Ola Hsd con pCMV-PrPm (A), pCMV-PrPh (B) y pCMV (línea discontinua en A y B). El antígeno utilizado para tapizar las placas del ELISA fue proteína PrP recombinante murina semipurificada expresada en *E.coli*

	Dilución 1/100	Dilución 1/200		Dilución 1/100	Dilución 1/200
pCMV-PrPh 1	0,791	0,623	pCMV-PrPm 1	0,175	0,211
pCMV-PrPh 2	0,626	0,411	pCMV-PrPm 2	0,173	0,153
pCMV-PrPh 3	0,318	0,174	pCMV-PrPm 3	0,147	0,154
pCMV-PrPh 4	0,249	0,184	pCMV-PrPm 4	0,126	0,120
pCMV-PrPh 5	0,571	0,376	pCMV-PrPm 5	0,135	0,132
pCMV-PrPh 6	0,100	0,089	pCMV-PrPm 6	0,120	0,102
pCMV-PrPh 7	0,225	0,155	pCMV-PrPm 7	0,133	0,130
pCMV-PrPh 8	0,134	0,110	pCMV-PrPm 8	0,146	0,139
pCMV 1	0,122	0,108	pCMV 1	0,211	0,219
pCMV 2	0,096	0,086	pCMV 2	0,174	0,162
pCMV 3	0,140	0,134	pCMV 3	0,122	0,119
pCMV 4	0,139	0,119	pCMV 4	0,099	0,087
pCMV 5	0,097	0,083	pCMV 5	0,138	0,125
pCMV 6	0,120	0,088	pCMV 6	0,130	0,095
pCMV 7	0,117	0,119	pCMV 7	0,143	0,136
pCMV 8	0,164	0,208	pCMV 8	0,117	0,112

D.O. 405nm

**Tabla 9:** Número de animales y títulos de anticuerpos neutralizantes obtenidos tras la inmunización de ratones Hsd:ICR (CD1) con los plásmidos pCMV, pCMV-BTT y pCMV-spBTT. Como control positivo, un grupo de animales fue inoculado con el virus C-S8c1 inactivado químicamente (BEI).

	Título seroneutralización
pCMV (1-13)	negativos
pCMV-BTT (1-12)	negativos
pCMV-spBTT 1	negativos
pCMV-spBTT 2	negativos
pCMV-spBTT 3	1,6
pCMV-spBTT 4	negativos
BEI-C-S8c1 1	2,4
BEI-C-S8c1 2	2,3
BEI-C-S8c1 3	2,4
BEI-C-S8c1 4	2,3

Título seroneutralización: Valor recíproco de aquella dilución del suero en la cual se observó un 50% de reducción de placas de lisis.

**Figura 13** Resultados del ELISA específico frente al péptido A24 de FMDV (blanco) y frente al virus FMDV (negro) utilizando sueros individuales de ratones inmunizados con pCMV, pCMV-BTT y pCMV-spBTT. Los sueros fueron obtenidos 2 semanas tras la tercera última inmunización y utilizados a una dilución 1:35 en PBS.

	Péptido A24	Virus C-S8c1
pCMV	0,220	0,114
pCMV-BTT	0,217	0,116
pCMV-spBTT	0,605	1,107

D.O. 492nm

**Página 83:** De una manera similar a lo observado en ratón (Tabla 9), únicamente uno de todos los animales vacunados fue capaz de generar una respuesta de anticuerpos neutralizantes, coincidiendo de nuevo con uno de los 4 animales (25%) inmunizados con la construcción pCMV-spBTT (Figura no mostrada).

	Título seroneutralización
pCMV 1 y 2	negativos
BEI-C-S8c1	1,9
pCMV-BTT (1-4)	negativos
pCMV-spBTT 1	negativos
pCMV-spBTT 2	2,1
pCMV-spBTT 3	negativos
pCMV-spBTT 4	negativos

Título seroneutralización: Valor recíproco de aquella dilución del suero en la cual se observó un 50% de reducción de placas de lisis.

**Figura 15.** Los cerdos se inmunizaron 2 veces con la vacuna inactivada (Vac. Inac. P4) o tres veces con los plásmidos pCMV (P1), pCMV-BTT (P5) o pCMV-spBTT (P9), y tres semanas tras la última dosis, se sangraron para medir la respuesta proliferativa de sus linfocitos de sangre en respuesta al VFA. Las respuestas proliferativas de los cerdos fueron medidas tanto en ausencia de anticuerpos (en blanco), como en presencia de anticuerpos anti-clase I (en gris) o anti-clase II (en negro). Los valores representados corresponden a la media de tres réplicas. Valores por debajo de 1000  $\Delta$ cpm fueron considerados como negativos.

	$\Delta$ cpm ausencia anticuerpos	$\Delta$ cpm anticuerpo clase I	$\Delta$ cpm anticuerpo clase II
pCMV (P1)	0	0	0
BEI-C-S8c1 (P4)	13000	12500	0
pCMV-BTT (P7)	6811	0	200
pCMV-spBTT (P9)	3556	1796	1252

CPM: cuentas por minuto.

**Figura 16:** Resultados del ELISA utilizando los sueros obtenidos tras inmunizar ratones con pCMV-PrPh (A), pCMV-E200K (B), pCMV-D178N (C), pCMV-A117V (D) y el control negativo pCMV (líneas discontinuas en todos los paneles). En todos los casos se utilizó proteína PrP recombinante murina como antígeno para tapizar las placas del ELISA.

Dilución 1/100    Dilución 1/200			Dilución 1/100    Dilución 1/200		
pCMV-PrPh 1	0,791	0,623	pCMV-A117V 1	0,100	0,083
pCMV-PrPh 2	0,626	0,411	pCMV-A117V 2	0,135	0,093
pCMV-PrPh 3	0,318	0,174	pCMV-A117V 3	0,109	0,092
pCMV-PrPh 4	0,249	0,184	pCMV-A117V 4	0,317	0,229
pCMV-PrPh 5	0,571	0,376	pCMV-A117V 5	0,121	0,105
pCMV-PrPh 6	0,100	0,089	pCMV-A117V 6	0,211	0,131
pCMV-PrPh 7	0,225	0,155	pCMV-A117V 7	0,311	0,178
pCMV-PrPh 8	0,134	0,110	pCMV-A117V 8	0,175	0,123
pCMV-E200K 1	0,123	0,124	pCMV 1	0,122	0,108
pCMV-E200K 2	0,201	0,214	pCMV 2	0,096	0,086
pCMV-E200K 3	0,791	0,708	pCMV 3	0,140	0,134
pCMV-E200K 4	0,108	0,096	pCMV 4	0,139	0,119
pCMV-E200K 5	0,164	0,143	pCMV 5	0,097	0,083
pCMV-E200K 6	0,115	0,085	pCMV 6	0,120	0,088
pCMV-E200K 7	0,136	0,146	pCMV 7	0,117	0,119
pCMV-E200K 8	0,121	0,122	pCMV 8	0,164	0,208
pCMV-D178N 1	0,140	0,074			
pCMV-D178N 2	0,098	0,082			
pCMV-D178N 3	0,147	0,104			
pCMV-D178N 4	0,343	0,224			
pCMV-D178N 5	0,234	0,157			
pCMV-D178N 6	0,103	0,080			
pCMV-D178N 7	0,105	0,084			
pCMV-D178N 8	0,132	0,103			

D.O. 405nm

**Figura 17:** Resultados del ELISA utilizando los sueros obtenidos tras inmunizar ratones con pCMV-PrPh, pCMV-E200K, pCMV-D178N, pCMV-A117V y el control negativo pCMV. Los antígenos utilizados para tapizar las placas del ELISA fueron la proteína del prión recombinante murina en forma nativa (blanco) y desnaturalizada (gris). Todos los sueros fueron utilizados a una dilución 1/50. Los valores de D.O. por debajo de la línea discontinua se consideraron negativos.

	PrP rec	PrP desnat		PrP rec	PrP desnat
pCMV-PrPh 1	0,093	0,158	pCMV-A117V 1	0,049	0,000
pCMV-PrPh 2	0,464	1,006	pCMV-A117V 2	0,013	0,000
pCMV-PrPh 3	0,065	0,113	pCMV-A117V 3	0,008	0,000
pCMV-PrPh 4	0,016	0,003	pCMV-A117V 4	0,099	0,117
pCMV-PrPh 5	0,596	1,230	pCMV-A117V 5	0,002	0,007
pCMV-PrPh 6	0,026	0,009	pCMV-A117V 6	0,134	0,198
pCMV-PrPh 7	0,534	1,608	pCMV-A117V 7	0,017	0,115
pCMV-PrPh 8	0,086	0,281	pCMV-A117V 8	0,187	0,209
pCMV-E200K 1	0,006	0,000	pCMV 1	0,110	0,210
pCMV-E200K 2	0,006	0,000	pCMV 2	0,003	0,002
pCMV-E200K 3	0,759	2,238	pCMV 3	0,199	0,000
pCMV-E200K 4	0,129	1,525	pCMV 4	0,010	0,098
pCMV-E200K 5	0,036	1,011	pCMV 5	0,135	0,000
pCMV-E200K 6	0,000	0,104	pCMV 6	0,064	0,215
pCMV-E200K 7	0,007	0,000	pCMV 7	0,069	0,003
pCMV-E200K 8	0,042	0,118	pCMV 8	0,002	0,128
pCMV-D178N 1	0,161	1,001			
pCMV-D178N 2	0,005	0,000			
pCMV-D178N 3	0,156	0,995			
pCMV-D178N 4	0,000	0,000			
pCMV-D178N 5	0,003	0,000			
pCMV-D178N 6	0,113	1,547			
pCMV-D178N 7	0,156	1,156			
pCMV-D178N 8	0,148	1,259			

D.O. 405nm

**Página 91:** Mientras que el 50% de los animales vacunados con pCMV-PrPhET inducían anticuerpos capaces de reconocer el prión en su forma nativa, las variantes mutadas provocaron la inducción de anticuerpos que reconocían mayoritariamente epítopos lineales del mismo (resultados no mostrados).

	PrP rec	PrP desnat		PrP rec	PrP desnat
pCMV-PrPhET 1	0,055	0,147	pCMV-spET 1	0,063	0,095
pCMV-PrPhET 2	1,023	1,122	pCMV-spET 2	0,055	0,171
pCMV-PrPhET 3	0,069	0,266	pCMV-spET 3	0,156	0,173
pCMV-PrPhET 4	0,951	1,766	pCMV-spET 4	0,070	0,102
pCMV-E200KET 1	0,059	0,114	pCMV-ET 1	0,058	0,071
pCMV-E200KET 2	0,054	0,083	pCMV-ET 2	0,169	0,174
pCMV-E200KET 3	0,395	2,609	pCMV-ET 3	0,114	0,225
pCMV-E200KET 4	0,260	0,981	pCMV-ET 4	0,197	0,207
pCMV-D178NET 1	0,112	0,914	pCMV 1	0,053	0,063
pCMV-D178NET 2	0,089	0,751	pCMV 2	0,155	0,196
pCMV-D178NET 3	0,065	0,120	pCMV 3	0,070	0,073
pCMV-D178NET 4	0,052	1,839	pCMV 4	0,122	0,130
pCMV-A117VET 1	0,054	0,123			
pCMV-A117VET 2	0,059	0,107			
pCMV-A117VET 3	0,071	0,090			
pCMV-A117VET 4	0,064	0,118			

D.O. 405nm



**Figura 18:** Porcentaje de células TCD8<sup>+</sup> que expresan IFN- $\gamma$  en respuesta al estímulo específico (círculos), tras la inmunización de ratones C57 BL/6JOlaHsd con los diferentes plásmidos señalados en la figura. Como control positivo del ensayo, se utilizaron dos ratones previamente infectados con una dosis subletal del virus LCMV.

%Células TCD8+, IFN $\gamma$ +		%Células TCD8+, IFN $\gamma$ +	
pCMV-PrPhET 1	0,12	pCMV-spET 1	0,13
pCMV-PrPhET 2	1,8	pCMV-spET 2	0,09
pCMV-PrPhET 3	0,07	pCMV-spET 3	0,08
pCMV-PrPhET 4	0,23	pCMV-spET 4	8,8
pCMV-E200KET 1	0,27	pCMV-ET 1	5,2
pCMV-E200KET 2	0,34	pCMV-ET 2	0,16
pCMV-E200KET 3	10,8	pCMV-ET 3	0,19
pCMV-E200KET 4	11,9	pCMV-ET 4	0,26
pCMV-D178NET 1	7,2	pCMV 1	0
pCMV-D178NET 2	10,9	pCMV 2	0
pCMV-D178NET 3	0,31	pCMV 3	0
pCMV-D178NET 4	19,8	pCMV 4	0
pCMV-A117VET 1	39,9	LCMV 1	15,5
pCMV-A117VET 2	0,26	LCMV 2	15,1
pCMV-A117VET 3	7,3	Los valores obtenidos son resultado de restar el fondo definido por pCMV	
pCMV-A117VET 4	0,09		

**Figura 19:** Ratones C57 BL/6J OlaHsd fueron inmunizados con pCMV-PrPh ET, pCMV-E200KET, pCMV-D178NET, pCMV-A117VET, pCMV-spPrPhET, pCMV-ET y pCMV. Todos los animales fueron desafiados con LCMV (incluyendo un grupo previamente vacunado con una dosis subletal del LCMV), 4 días tras el desafío fueron sacrificados y los bazo triturados y utilizados como inóculo infeccioso sobre células Vero. El resultado de carga viral se muestra como número de unidades formadoras de placas (ufp) por cada gramo de tejido. La línea discontinua indica el umbral por debajo del cual se considera como totalmente protegido a un animal.

	ufp/g		ufp/g
pCMV-PrPhET 1	55814	pCMV-spET 1	131147
pCMV-PrPhET 2	17045	pCMV-spET 2	128712
pCMV-PrPhET 3	123839	pCMV-spET 3	1709401
pCMV-PrPhET 4	47337	pCMV-spET 4	7905
pCMV-E200KET 1	35242	pCMV-ET 1	45602
pCMV-E200KET 2	58981	pCMV-ET 2	328767
pCMV-E200KET 3	5555	pCMV-ET 3	61016
pCMV-E200KET 4	2531	pCMV-ET 4	217391
pCMV-D178NET 1	2205	pCMV 1	200668
pCMV-D178NET 2	0	pCMV 2	131805
pCMV-D178NET 3	3663003	pCMV 3	182053
pCMV-D178NET 4	682	pCMV 4	71523
pCMV-A117VET 1	3065	LCMV 1	0
pCMV-A117VET 2	99009	LCMV 2	0
pCMV-A117VET 3	2371	LCMV 3	0
pCMV-A117VET 4	133779	LCMV 4	0

**Figura 20:** Ratones 129P2/OlaHsd fueron inmunizados con las construcciones pCMV-PrPh, pCMV-E200K, pCMV-D178N, pCMV-A117V y pCMV y posteriormente fueron desafiados intracranealmente con una dosis letal de inóculo de príon infeccioso adaptado a ratón (ver materiales y métodos). En el gráfico de barras se representan los días transcurridos desde la infección de los animales hasta el día de su sacrificio (estado terminal de la enfermedad), indicándose así mismo la desviación estándar existente dentro de cada grupo.

Días post desafío		Días post desafío	
pCMV-PrPh 1	131	pCMV-A117V 1	131
pCMV-PrPh 2	123	pCMV-A117V 2	131
pCMV-PrPh 3	131	pCMV-A117V 3	131
pCMV-PrPh 4	131	pCMV-A117V 4	123
pCMV-E200K 1	131	pCMV 1	131
pCMV-E200K 2	131	pCMV 2	131
pCMV-E200K 3	131	pCMV 3	131
pCMV-E200K 4	131	pCMV 4	131
pCVM-D178N 1	120		
pCVM-D178N 2	131		
pCVM-D178N 3	131		
pCVM-D178N 4	131		

**Figura 24:** Diluciones seriadas de sueros de ratones PrPKO inmunizados 3 veces con pCMV-PrPm (círculos), pCMV-UbPrPm (triángulos), pCMV-PrPmLII (cuadrados) y pCMV (rectángulos), fueron testados mediante la técnica de ELISA en placas tapizadas con PrP recombinante murina. Las barras representan las desviaciones estándar encontradas para cada grupo.

	Dil 1:400	Dil 1:800	Dil 1:1600	Dil 1:3200	Dil 1:6400	Dil 1:12800
pCMV-PrPm 1	1,401	1,297	0,789	0,698	0,493	0,400
pCMV-PrPm 2	1,680	1,296	0,718	0,710	0,503	0,397
pCMV-PrPm 3	1,097	1,403	0,905	0,684	0,512	0,398
pCMV-PrPm 4	1,405	1,002	0,812	0,691	0,499	0,403
pCMV-UbPrPm 1	0,908	0,602	0,508	0,467	0,463	0,350
pCMV-UbPrPm 2	0,679	0,629	0,503	0,459	0,494	0,351
pCMV-UbPrPm 3	0,802	0,553	0,510	0,463	0,473	0,356
pCMV-UbPrPm 4	0,811	0,526	0,507	0,460	0,469	0,354
pCMV-PrPmLII 1	2,111	1,655	1,206	0,890	0,684	0,531
pCMV-PrPmLII 2	1,693	1,340	1,007	0,756	0,608	0,538
pCMV-PrPmLII 3	1,811	1,548	1,113	0,741	0,624	0,526
pCMV-PrPmLII 4	1,854	1,602	1,198	0,807	0,650	0,517
pCMV 1	0,550	0,453	0,416	0,452	0,436	0,422
pCMV 2	0,653	0,459	0,409	0,449	0,457	0,426
pCMV 3	0,521	0,454	0,402	0,438	0,435	0,420
pCMV 4	0,556	0,449	0,411	0,454	0,447	0,428

D.O. 405nm

**Figura 26:** Porcentaje de células TCD4<sup>+</sup> que expresan IFN- $\gamma$  en respuesta al estímulo específico (círculos) tras tres inmunizaciones con pCMV (2 paneles superiores) o con pCMV-PrPmLII (4 paneles inferiores) en ratones PrPKO.

	%Células TCD4+, IFN $\gamma$ + (PrPrec)	%Células TCD4+, IFN $\gamma$ + (RPMI)
pCMV-PrPm 1	0,01	0,01
pCMV-PrPm 2	0,01	0,01
pCMV-PrPm 3	0,01	0,01
pCMV-PrPm 4	0,01	0,02
pCMV-UbPrPm 1	0,01	0,02
pCMV-UbPrPm 2	0,01	0,01
pCMV-UbPrPm 3	0,01	0,01
pCMV-UbPrPm 4	0,01	0,01
pCMV-PrPmLII 1	0,15	0,01
pCMV-PrPmLII 2	0,13	0,01
pCMV-PrPmLII 3	0,12	0,01
pCMV-PrPmLII 4	0,14	0,03
pCMV 1	0,00	0,00
pCMV 2	0,00	0,00
pCMV 3	0,00	0,00
pCMV 4	0,00	0,00

Los valores obtenidos son resultado de restar el fondo definido por pCMV

**Página 105:** Como cabía esperar, tras una única dosis vacunal con pCMV-PrPmLII, la respuesta de anticuerpos inducida fue indetectable (datos no mostrados).

	Dil 1:400	Dil 1:800	Dil 1:1600	Dil 1:3200	Dil 1:6400	Dil 1:12800
pCMV-PrPmLII 1	0,416	0,311	0,245	0,201	0,179	0,171
pCMV-PrPmLII 2	0,574	0,568	0,496	0,457	0,398	0,361
pCMV-PrPmLII 3	0,395	0,364	0,358	0,327	0,315	0,308
pCMV-PrPmLII 4	0,406	0,411	0,362	0,35	0,264	0,197
pCMV 1	0,393	0,388	0,382	0,379	0,373	0,365
pCMV 2	0,552	0,475	0,424	0,401	0,41	0,39
pCMV 3	0,573	0,477	0,394	0,39	0,406	0,415
pCMV 4	0,153	0,153	0,151	0,15	0,156	0,153

D.O. 405nm

**Figura 27:** Porcentaje de células T-CD4<sup>+</sup> (4 paneles izquierda) y T-CD8<sup>+</sup> (4 paneles derecha) que expresan IFN- $\gamma$  en respuesta al estímulo específico (círculos), tras una inmunización con pCMV (4 paneles superiores) o con pCMV-PrPmLII (4 paneles inferiores) en ratones PrPKO.

	%Células TCD4+ IFN $\gamma$ + (PrPrec)	%Células TCD4+ IFN $\gamma$ + (RPMI)	%Células TCD8+ IFN $\gamma$ + (PrPrec)	%Células TCD8+ IFN $\gamma$ + (RPMI)
pCMV-PrPmLII 1	0,90	0,00	0,40	0,01
pCMV-PrPmLII 2	0,87	0,01	0,36	0,05
pCMV-PrPmLII 3	0,62	0,00	0,42	0,00
pCMV-PrPmLII 4	0,77	0,04	0,33	0,05
pCMV 1	0,00	0,00	0,00	0,00
pCMV 2	0,00	0,00	0,00	0,00
pCMV 3	0,00	0,00	0,00	0,00
pCMV 4	0,00	0,00	0,00	0,00

Los valores obtenidos son resultado de restar el fondo definido por Pcmv

**Figura 28:** Diluciones seriadas del suero extraído 6 semanas tras la tercera y última inmunización de ratones normales inmunizados con pCMV-PrPm (círculos), pCMV UbPrPm (triángulos), pCMV PrPmLII (cuadrados) y pCMV (rectángulos), fueron testados mediante la técnica de ELISA en placas tapizadas con PrP recombinante murina. Las barras representan las desviaciones estándar observadas entre animales dentro del mismo grupo

	Dil 1:50	Dil 1:100	Dil 1:200
pCMV-PrPm 1	0,326	0,246	0,405
pCMV-PrPm 2	0,458	0,369	0,237
pCMV-PrPm 3	0,684	0,278	0,452
pCMV-PrPm 4	0,212	0,561	0,556
pCMV-UbPrPm 1	0,604	0,397	0,391
pCMV-UbPrPm 2	0,496	0,43	0,334
pCMV-UbPrPm 3	0,454	0,432	0,369
pCMV-UbPrPm 4	0,521	0,364	0,402
pCMV-PrPmLII 1	1,426	0,453	0,954
pCMV-PrPmLII 2	1,481	0,774	0,698
pCMV-PrPmLII 3	1,720	0,987	0,526
pCMV-PrPmLII 4	1,257	1,023	0,350
pCMV 1	0,489	0,472	0,469
pCMV 2	0,458	0,41	0,336
pCMV 3	0,605	0,698	0,489
pCMV 4	0,689	0,645	0,42

D.O. 405nm

**Figura 30:** Porcentaje de células T-CD4<sup>+</sup> (4 paneles izquierda) y T-CD8<sup>+</sup> (4 paneles derecha) que expresan IFN- $\gamma$  en respuesta al estímulo específico (círculos) tras tres inmunizaciones con pCMV-PrPmLII. Los resultados mostrados corresponden a dos ratones inmunizados con este plásmido.

	%Células TCD4+ IFN $\gamma$ + (PrPrec)	%Células TCD4+ IFN $\gamma$ + (RPMI)	%Células TCD8+ IFN $\gamma$ + (PrPrec)	%Células TCD8+ IFN $\gamma$ + (RPMI)
pCMV-PrPm 1	0,01	0,00	0,00	0,00
pCMV-PrPm 2	0,01	0,01	0,02	0,01
pCMV-PrPm 3	0,00	0,02	0,03	0,01
pCMV-PrPm 4	0,03	0,04	0,00	0,01
pCMV-UbPrPm 1	0,04	0,03	0,01	0,00
pCMV-UbPrPm 2	0,00	0,00	0,01	0,00
pCMV-UbPrPm 3	0,02	0,01	0,00	0,01
pCMV-UbPrPm 4	0,01	0,02	0,01	0,00
pCMV-PrPmLII 1	0,65	0,00	0,50	0,00
pCMV-PrPmLII 2	0,90	0,04	0,60	0,00
pCMV-PrPmLII 3	0,74	0,01	0,47	0,03
pCMV-PrPmLII 4	0,87	0,00	0,53	0,02
pCMV 1	0,00	0,00	0,00	0,00
pCMV 2	0,00	0,00	0,00	0,00
pCMV 3	0,00	0,00	0,00	0,00
pCMV 4	0,00	0,00	0,00	0,00

Los valores obtenidos son resultado de restar el fondo definido por pCMV

**Figura 31:** Ratones normales fueron inmunizados con pCMV-PrPmLII, pCMV-UbPrPm, pCMV-PrPm y pCMV (4 por grupo). Seis semanas tras la última inmunización, todos los animales fueron infectados intracranealmente con una dosis letal de príon infeccioso. Los bloques sólidos indican el tiempo transcurrido desde la infección hasta la aparición de los primeros síntomas clínicos de la enfermedad. Las barras indican la desviación Standard encontrada para cada grupo.

	Días transcurridos desde la infección hasta la aparición de los primeros síntomas clínicos.
pCMV-PrPm 1	68
pCMV-PrPm 2	57
pCMV-PrPm 3	52
pCMV-PrPm 4	57
pCMV-UbPrPm 1	90
pCMV-UbPrPm 2	82
pCMV-UbPrPm 3	82
pCMV-UbPrPm 4	75
pCMV-PrPmLII 1	150
pCMV-PrPmLII 2	133
pCMV-PrPmLII 3	139
pCMV-PrPmLII 4	139
pCMV 1	73
pCMV 2	65
pCMV 3	65
pCMV 4	59